

**Charakterisierung von *Sporolactobacillus* Spezies und Prozessoptimierung zur
biotechnologischen Herstellung von D-Lactat**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Norman Kaufmann
aus Wolfsburg

1. Referentin oder Referent:

Professor Dr. Klaus-Dieter Vorlop

2. Referentin oder Referent:

Professor Dr. Adrian Schumpe

eingereicht am:

04.05.2016

mündliche Prüfung (Disputation) am:

09.09.2016

Druckjahr 2017

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Posterbeitrag:

Silvia Klotz, Norman Kaufmann, Anja Kuenz, Klaus-Dieter Vorlop., „*Biotechnological production of D-lactic acid – Specific supplementation and process optimization*“, 11th International Symposium on Lactic Acid Bacteria (LAB11), Egmond aan Zee, the Netherlands, 31 August-4 September **2014**

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich allen voran bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop bedanken, der es mir ermöglicht hat in seinem Arbeitskreis diese Dissertation anzufertigen. Seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft, seine Ermutigungen und das mir entgegengebrachte Vertrauen waren die Grundlage, auf welche diese Dissertation aufbaute.

Bei Herrn Prof. Dr. Adrian Schumpe möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats bedanken. Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Udo Rau für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Mein herzlichster Dank geht ebenfalls an Sophie Sachse, Susana de la Moreno Lopez, Heike Horn und Lena-Luisa Gephardt für die Mithilfe bei der Umsetzung dieses Projekts. Ein besonderer Dank geht auch an Frau Dr. Anja Kuenz für die fachliche Unterstützung sowie für die konstruktive Hilfestellung bei der Anfertigung des Manuskripts. Des Weiteren geht mein Dank an Dennis Jäger für die Unterstützung bei analytischen Fragestellungen und an Silvia Klotz für die Zusammenarbeit im Labor und Büro sowie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und den Ideenaustausch.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des Thünen-Instituts für das tolle Arbeitsklima und die allgemeine Hilfsbereitschaft danken. Insbesondere geht mein Dank an: Susan Krull, Linda Teevs, Marina Heuer, Malee Kalbach, Eric Weingart, Dr. Christian Kaufmann, Dr. Nico Anders, Henning Kuhz, Gianfranco Laurenzano, Martin Ciaston, Dr. Jochen Hahne, Dr. Ulf Prüße, Dr. Henning Storz, Dr. Heinz Stichnothe, Hiltrud Nilson, Sophia Dietel, Michaela Grau, Jano Anter, Cornelius Staude, Liselotte Bruhn-Kaczmarek, Monika Klick, Hans-Jürgen Helke, Marco Hirsch, Martina Heine, Frank Brandes, Elena Geisler, Doris Steinkraus, Bettina Hübner, Birthe Bogunovic, Jans Büüs, Julia Hellert, Lothar Jurczyk, Dr. Joachim Brunotte, Dr. Thomas Wilke, Jörn Oetken und Antje Hevekerl. Ein weiterer Dank geht an die FNR und die Südzucker AG für die finanzielle Unterstützung des Projekts.

Ein ganz besonderer und liebevoller Dank geht an Dr. Ann Christin Fecker, die mir während des Zusammenschreibens sehr viel Kraft gegeben hat und stets an mich glaubte.

Mein allerherzlichster Dank gilt schließlich meiner Familie. Aus tiefstem Herzen danke ich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten, mich währenddessen immer unterstützten und mir liebevoll zur Seite standen.

*Für meine Eltern
und
Ann Christin*

Abkürzungsverzeichnis/ Definitionen

Abkürzung	Erklärung
ATP	Adenosintriphosphat
B	Batch
BTM	Biotrockenmasse
d	Tage
D-LAB	D-Lactic-Acid-Bacteria
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EFSA	European-Food-Safety-Authority/ Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FB	Fed-Batch
FBB	Fibrous-Bed-Reactor
FE	Fleischextrakt
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
GYP-Medium	Glucose-Yeast-Peptone-Medium
h	Stunde
H ₂	(molekularer) Wasserstoff
HE	Hefeextrakt
HLa	Nicht dissoziierte Milchsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography/ Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IE	Ionentauscher
kT	Kilotonne
Lac-	Dissoziierte Milchsäure
Lag-Phase	Anlaufphase der Bakterien bis zu einem Zeitpunkt, ab dem die Bakterien beginnen zu wachsen bzw. D-Lactat zu produzieren
M (Molarität)	mol/l
MFR	Membrane-Integrated-Fermentation-Reactor
Mikroaerobe Bedingungen	Die maximale theoretische Sättigung von O ₂ bei 38 °C (6,6 mg/l) im Verhältnis zur maximalen O ₂ -Sättigung (8,2 mg/l) bei Standardnormalbedingungen, sprich 75 %
mM	millimol/l
MO	Mikroorganismus
mV	millivolt
N ₂	(molekularer) Stickstoff
NAD(P)	Nicotinamidadenin dinukleotid(phosphat)
NaOAc	Natriumacetat
O ₂	(molekularer) Sauerstoff
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline/ Phosphatpuffer
PDLA	Poly-D-Lactic Acid/ Poly-D-Milchsäure
PDLLA	Poly-D,L-Lactic-Acid/ Poly-D,L-Milchsäure

PE	Polyethylen
PET	Polyethylenterephthalat
PJ	Palm-Jaggery-Rohrzucker/ Palmenrohrzucker
PLA	Poly-Lactic-Acid/ Polymilchsäure
PLLA	Poly-L-Lactic-Acid/ Poly-L-Milchsäure
PMF	Proton Motive Force/ Protonenmotorische Kraft
PT	Pepton/ Trypton
PVA	Polyvinylalkohol
RI	Refraction-Index (Brechungsindex)
ROP	Ringöffnungspolymerisation
RPM	Rounds Per Minute
RS	Rapsschrot
s	Sekunde
SHF	Seperate Hydrolysis and Fermentation
slph	Molekülmenge Gas pro Stunde die bei 1013,25 mbar durch 1 Liter fließt
SSF	Simultaneous Saccharification and Fermentation
Standard- bedingungen	1013,15 mbar und 25 °C
TBP	Tributylphosphat
TPS	Thermoplastische Stärke
TR	Trypton
üN	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
VK	Vorkultur
vvm	Gasvolumen pro Volumen Medium und Minute
wt%	Gewichtsprozent
w/v	Gewicht pro Volumen
ZRDS	Zuckerrübensüßsaft

Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1:	Darstellung der prozentualen Marktanteile von technischen Biopolymeren anhand der Daten von European Bioplastics, Institute for Bioplastics and Biocomposites, nova-Institute (2014) [5]. A Biobasierter Anteil von 30 %.	2
Abbildung 1.2:	Generelle Syntheseroute des PLA-Stereoblocks ausgehend von den beiden Enantiomeren der (D- und L-) Milchsäure über die (D,D-/meso- und L,L-) Lactide hin zu den Homopolymeren PDLA und PLLA modifiziert nach Tsuji et al. (2005) [12].	4
Abbildung 1.3:	Vereinfachte Darstellung der Stoffwechselwege von D-Milchsäurebakterien. Phosphoketolase-Weg (links) und Glykolyse (rechts) [46,47, 49-51].	9
Abbildung 1.4:	Phospho-Trans-Acetylase-Acetatkinase-Stoffwechselweg (PTA-ACK-Weg). (A) Konversion von Phosphoenolpyruvat zu D-Lactat. (B) Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und Formiat mittels Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL). (C) Umesterung von Acetyl-CoA mit Hilfe einer Phosphotransacetylase (PTA) und anschließende Dephosphorylierung durch eine Acetatkinase (ACK) zu Acetat.	11
Abbildung 1.5:	Schematische Darstellung der Lactat-Exkretion und Produktinhibierung. Modifiziert nach [60-62].	12
Abbildung 1.6:	Vergleich der Aufreinigungsverfahren von Calciumlactat (oben) und Ammoniumlactat (unten). Nach Kasinathan et al. (2010) [78].	17
Abbildung 2.1:	Generelles Pipettierschema bei der Kultivierung der Bakterien im 96-Wellmaßstab mit 150 µl Arbeitsvolumen mittels FLUOstar Omega-Plattenreader.	24
Abbildung 2.2:	Arbeitsablauf für die Herstellung von Lentikats®.	29
Abbildung 2.3:	Korrelation zwischen der Zellzahl und der optischen Dichte (OD ₆₀₅).	30
Abbildung 2.4:	Pipettierschema zur der Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> mit 2 ml Arbeitsvolumen in Deep-96-Well-Platten-System.	31
Abbildung 2.5:	Schematische Darstellung eines DASbox® Mini-Bioreaktor mit apparativen Aufbau.	32
Abbildung 3.1:	Links sind die Untersuchung zur D-Lactatproduktion für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> anhand der Glucose- und Lactat-Konzentration [g/l] im GYP-Medium (100,0 g/l Glucose) dargestellt. Demgegenüber illustriert das rechte Diagramm die Messwerte der Lactat-Konzentration [g/l] und der optischen Dichte [OD ₆₀₅] im GYP-Medium bei einer Glucosekonzentration von 160,0 g/l. Beide Experimente wurden in 100 ml Arbeitsvolumen bei 0 RPM, 38 °C und 4,0 % Inokulum (Vorkultur OD ₆₀₅ = 0,4) durchgeführt. Neutralisationsmittel: 60,0 g/l CaCO ₃ .	43
Abbildung 3.2:	Korrelation zwischen Biotrockenmasse [g/l] und der optischen Dichte der Zellkulturen bei 605 nm (OD ₆₀₅) für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	44
Abbildung 3.3:	Links sind die Untersuchung zur D-Lactatproduktion für den <i>Sporolactobacillus putidus</i> anhand der Glucose- und Lactat-Konzentration [g/l] im GYP-Medium (100,0 g/l Glucose) dargestellt. Demgegenüber illustriert das rechte Diagramm	45

die Messwerte der Lactat-Konzentration [g/l] und der optischen Dichte [OD₆₀₅] im GYP-Medium bei einer Glucosekonzentration von 160,0 g/l. Beide Experimente wurden in 100 ml Arbeitsvolumen bei 0 RPM, 38 °C und 4,0 % Inokulum (Vorkultur OD₆₀₅= 0,4) durchgeführt. Neutralisationsmittel: 60,0 g/l CaCO₃.

- Abbildung 3.4:** Zellaggregation des *Sporolactobacillus putidus* im Bioreaktor mit NH₃·H₂O als Neutralisationsmittel. 45
- Abbildung 3.5:** HPLC-Chromatogramm nach 10 h Kultivierungsdauer für beide *Sporolactobacillus* Spezies. Säule: HPX-87H. Säulenmaterial: sulfoniertes Styrol-Divinylbenzol-Copolymer. Eluent: 5,0 mM H₂SO₄. Säulentemperatur: 60 °C. Druck: ~60 bar. Flussrate: 0,7 ml/ min; Injektionsvolumen: 20 µl. RI-Detektor. 46
- Abbildung 3.6:** Ligandenaustausch-Chromatogramm zur Bestimmung der optischen Reinheit der Lactat-Enantiomere hinsichtlich der Kultivierungen der *Sporolactobacillus* Spezies. 1. L-Lactat-Standard. 2. D-Lactat-Standard. Säulenmaterial: N,S-dioctyl-(D)-Penicillamin. Dieluent: 2,0 mM CuSO₄·5H₂O/ Isoprop. (95:5). Säulentemperatur: RT. Flussrate: 1 ml/ min. Druck: 100 bar. UV-Detektor bei 250 nm. 47
- Abbildung 3.7:** Einfluss verschiedener Temperaturen anhand der OD₆₀₅ nach 15 h für den *Sporolactobacillus inulinus* im 96-Well-Mikrotiterplatten-Maßstab in einem Arbeitsvolumen von 150 µl. Kultivierung im GYP-Medium mit 20,0 g/l Glucose (ungepuffert) bei einem Inokulum von 4,0 % (einer Vorkultur bei einer OD₆₀₅ von 0,4). Durchmischung vor jedem Messpunkt bei 500 RPM für 5 s. 48
- Abbildung 3.8:** Einfluss verschiedener Temperaturen anhand der OD₆₀₅ nach 15 h für den *Sporolactobacillus putidus* im 96-Well-Mikrotiterplatten-Maßstab in einem Arbeitsvolumen von 150 µl. Kultivierung im GYP-Medium mit 20,0 g/l Glucose (ungepuffert) bei einem Inokulum von 4,0 % (einer Vorkultur bei einer OD₆₀₅ von 0,4). Durchmischung vor jedem Messpunkt bei 500 RPM für 5 s. 49
- Abbildung 3.9:** Mikroskopische Untersuchungen von (A) gefälltem CaCO₃ und (B) gepulverten CaCO₃ im Phasenkontrast (20-fach Objektiv). 50
- Abbildung 3.10:** Einfluss von Calciumcarbonaten (gefällt/ gepulvert) für den *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 140,0 g/l Glucose bei 38 °C. 4 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD₆₀₅ von 0,4. V1: CaCO₃ gefällt bei 120 RPM. V2: CaCO₃ gefällt bei 0 RPM. V3: CaCO₃ gepulvert bei 120 RPM. V4: CaCO₃ gepulvert bei 0 RPM. 51
- Abbildung 3.11:** Einfluss von Calciumcarbonaten (gefällt/ gepulvert) für den *Sporolactobacillus putidus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 140,0 g/l Glucose bei 38 °C. 4 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD₆₀₅ von 0,4. V1: CaCO₃ gefällt bei 120 RPM. V2: CaCO₃ gefällt bei 0 RPM. V3: CaCO₃ gepulvert bei 120 RPM. V4: CaCO₃ gepulvert bei 0 RPM. 53
- Abbildung 3.12:** Einfluss der Stickstoffquellen für den *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 161,9 g/l Glucose bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD₆₀₅ von 0,4. Trypton und Pepton/ Trypton wurden entsprechend des Stickstoffgehalts (9,5 %) von 10,0 g/l Hefeextrakt eingesetzt. Neutralisationsmittel: 60,0 g/l CaCO₃. 54

Abbildung 3.13:	Einfluss der Variation der Hefeextraktkonzentration für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 168,3 g/l Glucose bei 35 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD ₆₀₅ von 0,4. Neutralisationsmittel: 60,0 g/l CaCO ₃ .	56
Abbildung 3.14:	Einfluss der Stickstoffquellen für den <i>Sporolactobacillus putidus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 122,1 g/l Glucose bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD ₆₀₅ von 0,4. Trypton und Pepton/ Trypton wurden entsprechend des Stickstoffgehalts (9,5 %) von 10,0 g/l Hefeextrakt eingesetzt. Neutralisationsmittel: 60,0 g/l CaCO ₃ .	57
Abbildung 3.15:	Einfluss der Variation der Hefeextraktkonzentration für den <i>Sporolactobacillus putidus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 123,4 g/l Glucose bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum (OD ₆₀₅ der Vorkultur von 0,4). Neutralisationsmittel: 60,0 g/l CaCO ₃ .	59
Abbildung 3.16:	Einfluss der Variation der Glucosestartkonzentration für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 60,0 g/l CaCO ₃ (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD ₆₀₅ von 0,4.	60
Abbildung 3.17:	Einfluss der Variation der Glucosestartkonzentration für den <i>Sporolactobacillus putidus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 60,0 g/l CaCO ₃ (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD ₆₀₅ von 0,4.	62
Abbildung 3.18:	Variation der NaOAc-Konzentration für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 150,0 g/l Glucose, 60,0 g/l CaCO ₃ (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD ₆₀₅ von 0,4.	64
Abbildung 3.19:	Variation der NaOAc-Konzentration für den <i>Sporolactobacillus putidus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 130,0 g/l Glucose, 60,0 g/l CaCO ₃ (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD ₆₀₅ von 0,4.	66
Abbildung 3.20:	Einfluss der Salze und Spurenelemente hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 150,0 g/l Glucose, 60,0 g/l CaCO ₃ (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD ₆₀₅ von 0,4.	69
Abbildung 3.21:	Variation von Sulfatsalzen der ersten Übergangsmetalle hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im GYP-Medium (2 ml Arbeitsvolumen) mit 80,0 g/l Glucose, 60,0 g/l CaCO ₃ (gepulvert, Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 0 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD ₆₀₅ von 0,4. Postivkontrolle: GYP-Medium mit Magnesiumsulfat und Spurenelementen. Negativkontrolle: GYP-Medium ohne Salze und Spurenelemente. Das GYP-Medium enthält bei den weiteren Ansätzen nur das Sulfatsalz des entsprechenden Elements in der angegebenen Konzentration (siehe Beschriftung).	70
Abbildung 3.22:	Einfluss der Salze und Spurenelemente hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus putidus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 130,0 g/l Glucose, 60,0 g/l CaCO ₃ (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD ₆₀₅ von 0,4.	72

Abbildung 3.23:	Untersuchungen von alternativen Kohlenstoffquellen zur D-Lactatproduktion für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 150,0 g/l C-Quelle, 60,0 g/l CaCO ₃ (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD ₆₀₅ von 0,4.	77
Abbildung 3.24:	Untersuchungen von alternativen Kohlenstoffquellen zur D-Lactatproduktion für den <i>Sporolactobacillus putidus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 150,0 g/l C-Quelle, 60,0 g/l CaCO ₃ (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD ₆₀₅ von 0,4.	78
Abbildung 3.25:	Untersuchungen von verschiedenen Glucose- und Saccharosekonzentrationen für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 60,0 g/l CaCO ₃ (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD ₆₀₅ von 0,4.	79
Abbildung 3.26:	Untersuchungen von verschiedenen Glucose- und Saccharosekonzentrationen für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 60,0 g/l CaCO ₃ (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD ₆₀₅ von 0,4.	80
Abbildung 3.27:	Einfluss von Kohlenstoffdioxid auf den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 150,0 g/l Glucose bei 38 °C. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD ₆₀₅ von 0,4. Begasungsrate 0,1 slph (N ₂ oder CO ₂) und 100 RPM Rührgeschwindigkeit. Der Start-pH-Wert wurde auf 6,2 eingestellt und ist entweder mit einer gesättigten KHCO ₃ -Lösung oder mit 3,0 M NaOH (pH 4,8) aufrechterhalten worden.	82
Abbildung 3.28:	Links: Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> mit N ₂ -Schutzgas und mikroaerob im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 150,0 g/l Glucose bei 38 °C. 4,0 % Inokulum (OD ₆₀₅ von 0,4 der Vorkultur). Begasungsrate 0,25 slph (N ₂) und 100 RPM Rührgeschwindigkeit. Start-pH-Wert 6,2 und pH-Sollwert 4,8. Neutralisationsmittel: 3,4 M NH ₃ ·H ₂ O. Rechts: Zeitliche Auflösung des Redoxpotentials des mikroaeroben Ansatzes.	83
Abbildung 3.29:	Variation der pH-Werte für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 150,0 g/l Glucose bei 38 °C und 100 RPM Rührgeschwindigkeit. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD ₆₀₅ von 0,4. Neutralisationsmittel: 3,4 M NH ₃ ·H ₂ O. Start-pH-Wert: 7,5.	85
Abbildung 3.30:	Variation der pH-Werte für den <i>Sporolactobacillus putidus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 130,0 g/l Glucose bei 38 °C und 100 RPM Rührgeschwindigkeit. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD ₆₀₅ von 0,4. Neutralisationsmittel: 3,4 M NH ₃ ·H ₂ O. Start-pH-Wert: 6,0.	86
Abbildung 3.31:	Variation der Inokula hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 150,0 g/l Glucose bei 38 °C und 120 RPM Rührgeschwindigkeit. Neutralisationsmittel: 60,0 g/l CaCO ₃ .	89
Abbildung 3.32:	Variation der Inokula hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus putidus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 120,0 g/l Glucose bei 38 °C und 120 RPM Rührgeschwindigkeit. Neutralisationsmittel: 60,0 g/l CaCO ₃ .	91
Abbildung 3.33:	Einfluss der Reaktionsführung (Batch und Fed-Batch) für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) bei 38 °C und 120 RPM Rührgeschwindigkeit. 10,0 % Inokulum (OD ₆₀₅ =2,0 der	93

	Vorkultur) Neutralisationsmittel: 60,0 g/l CaCO ₃ . Glucosestratkonzentration Batch (B) 150 g/l und im Fed-Batch 79,7 g/l.	
Abbildung 3.34:	Einfluss der Rührgeschwindigkeit im Bioreaktor für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 90 g/l Glucose bei 38 °C. 10,0 % Inokulum (OD ₆₀₅ =2,0 der Vorkultur) Neutralisationsmittel: 60,0 g/l CaCO ₃ . Rührgeschwindigkeit: FB1 750 RPM und FB2 250 RPM.	95
Abbildung 3.35:	Präzipitation von Ca-Lactat nach 50 h Kultivierungsdauer im Bioraktor bei 750 RPM.	96
Abbildung 3.36:	Untersuchungen zur Reaktionsführung mit NH ₃ ·H ₂ O im Bioreaktor für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit Glucosestartkonzentrationen von 78,5 g/l (FB) und 153,7 g/l (B) bei 38 °C und 250 RPM. 10,0 % Inokulum (OD ₆₀₅ =2,0 der Vorkultur). pH-Sollwert: 5,8. Neutralisationsmittel: 6,8 M NH ₃ ·H ₂ O.	97
Abbildung 3.37:	pH-Shift-Experimente im Bioreaktor für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 93,0 g/l Glucose, bei 38 °C und 250 RPM. 10,0 % Inokulum (OD ₆₀₅ =2,0 der Vorkultur). pH-Startwert: 6,2 und pH-Sollwert: 5,8. Neutralisationsmittel: 6,8 M NH ₃ ·H ₂ O.	99
Abbildung 3.38:	Repeated-Batch-Experimente mit 20,0 % Lentikats® (w/v) im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit durchschnittlich 132,0 g/l Glucose bei 38 °C und 120 RPM. Neutralisationsmittel 60,0 g/l CaCO ₃ .	102
Abbildung 3.39:	Darstellung des absoluten Glucoseverbrauchs und der Lactatproduktion für die einzelnen Batch-Experimente.	103
Abbildung 3.40:	Zeitlich aufgelöste Phosphatbestimmung mit Hilfe der Vanadat-Molybdat-Methode bei 435 nm für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im Bioreaktor, mit 150,0 g/l Glucose im GYP-Medium (Arbeitsvolumen 100 ml) bei 38 °C und 100 RPM. 4,0 % Inokulum (OD ₆₀₅ der Vorkultur von 0,4). Neutralisationsmittel: 60,0 g/l CaCO ₃ .	106
Abbildung 3.41:	Kultivierungsexperiment (100 ml Arbeitsvolumen) mit ZRDS (178,9 g/l Saccharose) als Kohlenstoffquelle, RS-Hydrolysat (21,2 g/l) als Stickstoffquelle, 650,0 mg/l Phosphat, 2,0 mM FeSO ₄ ·7H ₂ O, supplementiert mit Vitaminen bei 38 °C und 250 RPM. Inokulum 20,0 % Lentikats® (w/v). pH-Sollwert 5,8. Neutralisationsmittel: 6,8 M NH ₃ ·H ₂ O. pH-Shift bei einer Produktkonzentration von 56,2 g/l.	108
Abbildung 3.42:	Kultivierungsexperiment (100 ml Arbeitsvolumen) mit ZRDS (183,8 g/l Zucker) als Kohlenstoffquelle, RS-Hydrolysat (21,2 g/l) als Stickstoffquelle, 650,0 mg/l Phosphat, 1,0 mM FeSO ₄ ·7H ₂ O, supplementiert mit Vitaminen bei 38 °C und 250 RPM. Inokulum 20 % Lentikats® (w/v). pH-Sollwert 5,8. Neutralisationsmittel: 13,4 M NH ₃ ·H ₂ O. pH-Shift bei einer Produktkonzentration von ca. 50,0 g/l.	109
Abbildung 5.1:	Einfluss der Temperatur auf das Wachstum des <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	117
Abbildung 5.2:	Einfluss der Temperatur auf das Wachstum des <i>Sporolactobacillus putidus</i>	117
Abbildung 5.3:	Variation der Stickstoffquellen für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	118

Abbildung 5.4:	Variation der Hefeextraktkonzentration für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	118
Abbildung 5.5:	Variation der Stickstoffquellen für den <i>Sporolactobacillus putidus</i> .	119
Abbildung 5.6:	Variation der Hefeextraktkonzentration für den <i>Sporolactobacillus putidus</i> .	119
Abbildung 5.7:	Variation der Glucosestartkonzentration für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	120
Abbildung 5.8:	Variation der Glucosestartkonzentration für den <i>Sporolactobacillus putidus</i> .	120
Abbildung 5.9:	Variation der NaOAc-Konzentration für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	121
Abbildung 5.10:	Variation der NaOAc-Konzentration für den <i>Sporolactobacillus putidus</i> .	121
Abbildung 5.11:	Einfluss von Spurenelementen und Magnesiumsulfat auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	122
Abbildung 5.12:	Einfluss von Sulfat-Salzen der ersten Übergangsmetalle auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	122
Abbildung 5.13:	Einfluss von Spurenelementen und Magnesiumsulfat auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus putidus</i> .	123
Abbildung 5.14:	Untersuchung zur Nutzbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen bezüglich des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	123
Abbildung 5.15:	Untersuchung zur Nutzbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen bezüglich des <i>Sporolactobacillus putidus</i> .	124
Abbildung 5.16:	Untersuchung von alternativen Kohlenstoffquellen zur D-Lactat-Produktion hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	124
Abbildung 5.17:	Untersuchung von alternativen Kohlenstoffquellen zur D-Lactat-Produktion hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus putidus</i> .	125
Abbildung 5.18:	Untersuchung zum Saccharose/ Glucose-Metabolismus hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	125
Abbildung 5.19:	Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> unter Stickstoff (N ₂) -Atmosphäre.	126
Abbildung 5.20:	Ansatz mit NaOH unter N ₂ -Schutzgasatmosphäre.	126
Abbildung 5.21:	Ansatz mit NaOH unter CO ₂ -Schutzgasatmosphäre.	127
Abbildung 5.22:	Ansatz mit KHCO ₃ unter N ₂ -Schutzgasatmosphäre.	127
Abbildung 5.23:	Ansatz mit KHCO ₃ unter CO ₂ -Schutzgasatmosphäre.	127
Abbildung 5.24:	Untersuchung über den Einfluss des pH-Werts für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	128
Abbildung 5.25:	Untersuchung über den Einfluss des pH-Werts für den <i>Sporolactobacillus putidus</i> .	128
Abbildung 5.26:	Einfluss des Inokulums auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	129

Abbildung 5.27:	Einfluss des Inokulums auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus putidus</i> .	129
Abbildung 5.28:	Optimierung der D-Lactat-Produktion im Bioreaktor mittels pH-Shift für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> mit NH ₃ -Lösung als Neutralisationsmittel.	130
Abbildung 5.29:	Lentikat®-Linse nach Batch 4. Färbung der Zellen mit Carbol-Fuchsin.	130
Abbildung 5.30:	Quantitative Phosphatanalyse zur Bestimmung des Phosphatbedarfs hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im Bioreaktor in Korrelation zur Lactat-Konzentration.	131
Abbildung 5.31:	Chirale Messung der Lactatenantiomere. Links: Overlay 8-48 h von Ansatz 1. Rechts: Overlay 8-48 h von Ansatz 2.	131

Tabelle 1.1:	Tabelle 1.1: Gentechnisch veränderte Organismen (GVO) für die D-Lactatproduktion mittels Metabolic-Engineering und Ergebnisdaten der Fermentationsexperimente und Substrate.	7
Tabelle 1.2:	Auflistung der Ergebnisdaten von Fermentationsexperimenten mit konservativen Mutanten und Wildtyp-Stämmen für die D-LACTATPRODUKTION mit agrarischen Reststoffen.	14
Tabelle 2.1:	Alphabetische Liste der verwendeten Chemikalien und Lieferanten.	19
Tabelle 2.2:	Geräte/ Materialien mit Typbezeichnung und Hersteller/ Lieferanten.	20
Tabelle 2.3:	Bestandteile (links) des Vorkulturmediums und (rechts) die Zusammensetzung der Spurenelementlösung. Modifiziertes GYP-Medium (Glucose-Yeast-Peptone, DSMZ-Medium 852).	21
Tabelle 2.4:	Stammlösungen für die Hauptkultur und dessen Standardzusammensetzung. Modifiziertes GYP-Medium (Glucose-Yeast-Peptone, DZMZ-Medium 852).	22
Tabelle 2.5:	Lösungen und Puffer.	22
Tabelle 2.6:	Lösungen der Sulfatsalze und Stammlösung der alternativen Kohlenstoffquellen.	22
Tabelle 2.7:	Auflistung der getesteten Kohlenstoffquellen unter Angabe der eingesetzten Konzentrationen.	25
Tabelle 2.8	Technische Daten bezüglich der DASbox® Mini-Bioreaktor-Anlage.	33
Tabelle 2.9:	Gerätekomponenten, Spezifikationen und Parameter hinsichtlich der verwendeten HPLC-Methoden.	41
Tabelle 2.10:	Gerätekomponenten, Spezifikationen und Parameter hinsichtlich der chiralen HPLC-Messungen.	42
Tabelle 3.1:	Einfluss verschiedener Stickstoffquellen für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	55
Tabelle 3.2:	Einfluss der Hefeextraktkonzentration für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	56
Tabelle 3.3:	Einfluss verschiedener Stickstoffquellen für den <i>Sporolactobacillus putidus</i> .	58
Tabelle 3.4:	Einfluss der Hefeextraktkonzentration für den <i>Sporolactobacillus putidus</i> .	59
Tabelle 3.5:	Variation der Glucosestartkonzentration für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	61
Tabelle 3.6:	Variation der Glucosestartkonzentration für den <i>Sporolactobacillus putidus</i> .	63
Tabelle 3.7:	Ergebnisse der NaOAc-Variation im Medium für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	65
Tabelle 3.8:	Ergebnisse der NaOAc-Variation im Medium für den <i>Sporolactobacillus putidus</i> .	67
Tabelle 3.9:	Substratverwertbarkeit für die <i>Sporolactobacillus</i> Spezies nach Kohlenstoffquelle und Spezifikation.	74

Tabelle 3.10:	Ergebnisse der pH-Wert-Variation für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	86
Tabelle 3.11:	Ergebnisse der pH-Wert-Variation für den <i>Sporolactobacillus putidus</i> .	87
Tabelle 3.12:	Zusammenhang zwischen den getesteten pH-Werten und der Ausbeute für die <i>Sporolactobacillus</i> Spezies.	88
Tabelle 3.13:	Ergebnisse der Inokulavariation für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	90
Tabelle 3.14:	Ergebnisse der Inokulavariation für den <i>Sporolactobacillus putidus</i> .	91
Tabelle 3.15:	Vergleich von Ergebnisdaten der Batch- und Fed-Batch-Experimente.	94
Tabelle 3.16:	Fed-Batch-Experimente mit CaCO_3 als Neutralisationsmittel für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	96
Tabelle 3.17:	Reaktionsführung mit $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ als Neutralisationsmittel für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> .	98
Tabelle 3.18:	Ergebnisdaten für die pH-Shift-Experimente.	100
Tabelle 3.19:	Vor- und Nachteile der verwendeten Neutralisationsmittel.	101
Tabelle 3.20:	Vergleichsdaten verschiedener Fermentationsmethoden mit Zellimmobilisaten hinsichtlich der biotechnologischen Lactatproduktion.	104
Tabelle 3.21:	Daten hinsichtlich des Reaktorexperiments zur quantitativen Phosphatbestimmung.	106
Tabelle 3.22:	Ergebnisdaten des Kultivierungsexperiments mit ZRDS und RS bezüglich der Zellimmobilisate mit 6,8 M $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ als Neutralisationsmittel.	108
Tabelle 3.23:	Ergebnisdaten des Kultivierungsexperiments mit ZRDS und RS bezüglich der Zellimmobilisate mit 13,4 M $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ als Neutralisationsmittel.	110
Tabelle 3.24:	Probenahmezeitpunkte mit der dazugehörigen D-LACTATKONZENTRATION und dessen Enantiomerenüberschuss (ee) in Prozent	110
Tabelle 3.25:	Auflistung der Publikationen zur biotechnologischen D-Lactatproduktion auf der Basis agrarischer Reststoffe.	112
Tabelle 5.1:	DSMZ-Medium 852 (GYP-Medium).	118

1.	Einleitung	1
1.1	Technische Biopolymere	1
1.1.1	Bio-Polyethylen (PE) und Bio-Polyethylenterephthalat (PET)	2
1.1.2	Bioabbaubare Stärkeblends	2
1.1.3	Bioabbaubare Polyester	3
1.1.4	Polymilchsäure (PLA)	3
1.2	Industrielle Produktion von Milchsäure und Marktsituation	5
1.3	D-Milchsäure-Biokatalysatoren	6
1.3.1	Metabolic Engineering	6
1.3.2	Gentechnisch veränderte Organismen (GVO)	8
1.3.3	D-Milchsäurebakterien (D-LAB) und Zuckermetabolismus	9
1.3.4	Acetat-Metabolismus	11
1.3.5	Energie-Recycling und Produktinhibierung	12
1.4	Biotechnologische D-Lactatproduktion mit agrarischen Reststoffen	13
1.5	Neutralisationsmittel und Produktaufreinigung	16
1.6	Zielsetzung der Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Allgemeine Anmerkungen zu Chemikalien und Lösungen	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Geräte/ Materialien	20
2.1.3	Medien und Lösungen	21
2.2	Organismen und Stammhaltung	23
2.2.1	Herstellung der Flüssigkultur	23
2.2.2	Herstellung der Kryokulturen	23
2.3	Kultivierungsexperimente in Mikrotiterplatten	23
2.3.1	Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf das Wachstum der <i>Sporolactobacillus</i> Spezies	24
2.3.2	Untersuchung zur Nutzbarkeit unterschiedlicher Kohlenstoffquellen bezüglich der <i>Sporolactobacillus</i> Spezies	25
2.4	Kultivierung der Bakterien in Erlenmeyerkolben	26
2.4.1	Untersuchung zur Nutzbarkeit von Glycerin als Kohlenstoffquelle	26
2.4.2	Allgemeine Charakterisierung der <i>Sporolactobacillus</i> Spezies	26
2.4.3	Allgemeine Kultivierungsbedingungen für die <i>Sporolactobacillus</i> Spezies	27

2.4.4	Medienoptimierung/ Substrattests und Variation der Inokula	27
2.5	Herstellung von Lentikats® zur Immobilisierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> und Repeated Batch	29
2.6	Experimente zum Einfluss von Sulfat-Salzen der ersten Übergangsmetalle auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im Deep-Well/ Duetz®-System	31
2.7	Kultivierung im Bioreaktor (DASbox® Mini-Bioreaktor-System für die Mikrobiologie, Eppendorf) und Reaktionsparameteroptimierung	32
2.8	Analytik	36
2.8.1	Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)	36
2.8.2	Bestimmung der Zellzahl und Mikroskopie	37
2.8.3	Bestimmung der optischen Dichte (OD)	37
2.8.4	Berechnung der Produktivität	38
2.8.5	Berechnung des Maximalumsatzes	38
2.8.6	Berechnung der Selektivität	38
2.8.7	Berechnung der Ausbeute	39
2.8.8	Quantitative Phosphatbestimmung mittels Vanadat-Molybdat-Methode	39
2.8.9	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, High-Performance-Liquid-Chromatography)	40
2.8.10	Enantiomerenbestimmung mittels chiraler Ligandenaustausch-HPLC	42
3	Ergebnisse und Diskussion	43
3.1	Allgemeine Charakterisierung der <i>Sporolactobacillus</i> Spezies zur Eignung für die biotechnische Herstellung von D-Lactat	43
3.1.1	Allgemeine Charakterisierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	43
3.1.2	Allgemeine Charakterisierung des <i>Sporolactobacillus putidus</i>	44
3.1.3	Produktspektrum organischer Säuren hinsichtlich der <i>Sporolactobacillus</i> Spezies	46
3.1.4	Bestimmung der optischen Reinheit von D-Lactat	46
3.2	Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf das Wachstum der <i>Sporolactobacillus</i> Spezies	48
3.2.1	Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf das Wachstum des <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	48
3.2.2	Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf das Wachstum des <i>Sporolactobacillus putidus</i>	49
3.3	Allgemeine Kultivierungsbedingungen für die <i>Sporolactobacillus</i> Spezies	50
3.3.1	Allgemeine Kultivierungsbedingungen für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	51
3.3.2	Allgemeine Kultivierungsbedingungen für den <i>Sporolactobacillus putidus</i>	52
3.4	Medienoptimierung zur Kultivierung der <i>Sporolactobacillus</i> Spezies	54
3.4.1	Untersuchung verschiedener Stickstoffquellen zur Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	54

3.4.2	Bestimmung der Optimalkonzentration des Hefeextrakts zur Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	55
3.4.3	Untersuchung verschiedener Stickstoffquellen zur Kultivierung des <i>Sporolactobacillus putidus</i>	57
3.4.4	Bestimmung der Optimalkonzentration des Hefeextrakts zur Kultivierung des <i>Sporolactobacillus putidus</i>	58
3.4.5	Untersuchung der Glucosestartkonzentrationen für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	60
3.4.6	Untersuchung der Glucosestartkonzentrationen für den <i>Sporolactobacillus putidus</i>	62
3.4.7	Einfluss von Natriumacetat auf die Kultivierung der <i>Sporolactobacillus</i> Spezies	64
3.4.7.1	Einfluss von Natriumacetat auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	64
3.4.7.2	Einfluss von Natriumacetat auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus putidus</i>	66
3.4.8	Einfluss von Spurenelementen und Magnesiumsulfat auf die Kultivierung der <i>Sporolactobacillus</i> Spezies	68
3.4.8.1	Einfluss von Spurenelementen und Magnesiumsulfat auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	68
3.4.8.2	Einfluss von Sulfatsalzen der ersten Übergangsmetalle auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	69
3.4.8.3	Einfluss von Spurenelemente und Magnesiumsulfat auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus putidus</i>	72
3.5	Untersuchung zur Nutzbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen bezüglich der <i>Sporolactobacillus</i> Spezies	73
3.6	Untersuchung von alternativen Kohlenstoffquellen zur D-Lactatproduktion hinsichtlich der <i>Sporolactobacillus</i> Spezies	76
3.6.1	Untersuchung von alternativen Kohlenstoffquellen zur D-Lactatproduktion hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	76
3.6.2	Untersuchung von alternativen Kohlenstoffquellen zur D-Lactatproduktion hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus putidus</i>	77
3.6.3	Untersuchung zum Saccharose/ Glucose-Metabolismus hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	79
3.7	Reaktionsparameteroptimierung im Bioreaktor und Erlenmeyerkolben zur Kultivierung der <i>Sporolactobacillus</i> Spezies	81
3.7.1	Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im Bioreaktor unter mikroaeroben/ anaeroben Bedingungen	81
3.7.1.1	Einfluss von Kohlenstoffdioxid (CO ₂) hinsichtlich der Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	82
3.7.1.2	Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> unter Stickstoff-Atmosphäre und mikroaeroben Bedingungen	83
3.7.2	Untersuchung über den Einfluss des pH-Werts für die <i>Sporolactobacillus</i> Spezies im Bioreaktor	84
3.7.2.1	Variation der pH-Werte für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	85
3.7.2.2	Variation des pH-Werts für den <i>Sporolactobacillus putidus</i>	86
3.7.3	Einfluss des Inokulums auf die Kultivierung der <i>Sporolactobacillus</i> Spezies im Erlenmeyerkolben	88
3.7.3.1	Einfluss des Inokulums auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	89
3.7.3.2	Einfluss des Inokulums auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus putidus</i>	90
3.7.4	Neutralisationsmittel und Reaktionsführung	92

3.7.4.1	Untersuchung zur Reaktionsführung im Erlenmeyerkolben für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> mit CaCO ₃ als Neutralisationsmittel	93
3.7.4.2	Optimierung der D-Lactatproduktion im Bioreaktor für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> mit CaCO ₃ als Neutralisationsmittel	95
3.7.4.3	Untersuchung zur Reaktionsführung im Bioreaktor für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> mit NH ₃ -Lösung als Neutralisationsmittel	97
3.7.4.4	Optimierung der D-Lactatproduktion im Bioreaktor mittels pH-Shift für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> mit NH ₃ -Lösung als Neutralisationsmittel	99
3.8	Repeated-Batch-Experimente mit immobilisierten Zellen des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im Erlenmeyerkolben	102
3.9	Quantitative Phosphatanalyse zur Bestimmung des Phosphatbedarfs hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im Bioreaktor	105
3.10	D-Lactatproduktion auf der Basis agrarischer Reststoffe hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im Bioreaktor	107
3.10.1	D-Lactatproduktion auf der Basis agrarischer Reststoffe hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> mit 6,8 M NH ₃ -Lösung als Neutralisationsmittel	107
3.10.2	D-Lactatproduktion auf der Basis agrarischer Reststoffe hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> mit 13,4 M NH ₃ -Lösung als Neutralisationsmittel	109
4	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	114
4.1	Zusammenfassende Diskussion	114
4.2	Ausblick	115
5	Anhang	117
5.1	Anhang: Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf das Wachstum des <i>Sporolactobacillus</i> Spezies	117
5.2	Anhang: Zusammensetzung DSMZ-Medium 852 (Glucose-Yeast-Peptide, GYP-Medium)	118
5.3	Anhang: Variation der Stickstoffquellen und der Hefeextraktkonzentration für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	118
5.4	Anhang: Variation der Stickstoffquellen und der Hefeextraktkonzentration für den <i>Sporolactobacillus putidus</i>	119
5.5	Anhang: Untersuchung der Glucosestartkonzentrationen für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	120
5.6	Anhang: Untersuchung der Glucosestartkonzentrationen für den <i>Sporolactobacillus putidus</i>	120
5.7	Anhang: Einfluss von Natriumacetat auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	121
5.8	Anhang: Einfluss von Natriumacetat auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus putidus</i>	121
5.9	Anhang: Einfluss von Spurenelementen und Magnesiumsulfat auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	122
5.10	Anhang: Einfluss von Sulfat-Salzen der ersten Übergangsmetalle auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	122
5.11	Anhang: Einfluss von Spurenelementen und Magnesiumsulfat auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus putidus</i>	123
5.12	Anhang: Untersuchung zur Nutzbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen bezüglich des <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	123
5.13	Anhang: Untersuchung zur Nutzbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen bezüglich des <i>Sporolactobacillus putidus</i>	124
5.14	Anhang: Untersuchung von alternativen Kohlenstoffquellen zur D-Lactatproduktion hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	124
5.15	Anhang: Untersuchung von alternativen Kohlenstoffquellen zur D-Lactatproduktion hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus putidus</i>	125

5.16	Anhang: Untersuchung zum Saccharose/ Glucose-Metabolismus hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	125
5.17	Anhang: Kultivierung des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> unter Stickstoff (N ₂)-Atmosphäre und Einfluss von Kohlenstoffdioxid (CO ₂)	126
5.18	Anhang: Untersuchung über den Einfluss des pH-Werts für den <i>Sporolactobacillus</i> Spezies	128
5.19	Anhang: Einfluss des Inokulums auf die Kultivierung des <i>Sporolactobacillus</i> Spezies	129
5.20	Anhang: Optimierung der D-Lactatproduktion im Bioreaktor mittels pH-Shift für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i> mit NH ₃ -Lösung als Neutralisationsmittel	130
5.21	Anhang: Immobilisierten Zellen mittels Lentikats [®] für den <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	130
5.22	Anhang: Quantitative Phosphatanalyse zur Bestimmung des Phosphatbedarfs hinsichtlich des <i>Sporolactobacillus inulinus</i> im Bioreaktor	131
5.23	Chirale Bestimmung der Lactat-Enantiomere hinsichtlich des Kultivierungsexperiments mit ZRDS und RS mit 13,4 M NH ₃ ·H ₂ O als Neutralisationsmittel	131
6	Literaturverzeichnis	132

1. Einleitung

Durch die Zunahme der Weltbevölkerung und durch das kontinuierliche Bestreben der Verbesserung des Lebensstandards der Menschheit steigt der globale Bedarf an Rohstoffen. Da die bisherige industrielle Grundlage maßgeblich auf der Verwendung fossiler Rohstoffe beruht, führt dies in absehbarer Zeit konsequenterweise zu einer Limitierung der weltweiten Erdölressourcen [1]. Demgegenüber steht eine steigende Umweltverschmutzung durch die petrochemisch basierte Industrie aufgrund der notwendigen Erschließung neuer Rohstoffquellen bzw. der Erhöhung der industriellen Produktion. Darüber hinaus beeinflusst die Nutzung fossiler Energiequellen das weltweite Klima, indem es durch Treibhauseffekt zu einer globalen Erderwärmung kommt. Dies wird unabsehbare Konsequenzen für die weltweiten Ökosysteme und somit auch für die Ressourcenverfügbarkeit haben [2].

Diese Gründe lenken immer stärker das allgemeine Umweltbewusstsein von der Petrochemie weg, hin zu einer nachhaltigen Nutzung der zur Verfügung stehenden Rohstoffe auf der Basis von erneuerbaren Ressourcen, wie z.B. aus agrarischen Reststoffen. Die Herausforderung für die Implementierung dieses Nachhaltigkeitsprinzips ist die Entwicklung neuer Technologien sowie der Etablierung neuerartiger chemischer und biotechnologischer Methoden zur Herstellung von Basischemikalien, welche wiederum als Ausgangsstoffe für technische Biopolymere für die Automobilindustrie, Verpackung und für die Textilindustrie dienen können.

1.1 Technische Biopolymere

Die globale Polymerproduktion liegt bei 300 Millionen Tonnen pro Jahr (2015), wobei geschätzt wird, dass ca. 85 % der globalen Erzeugung durch technische Biopolymere ersetzt werden können [3, 4]. Infolgedessen steigt die Nachfrage für technische Biopolymere stetig an, wodurch sich ein schnell wachsender Markt entwickelt hat. Nichtsdestotrotz lagen die weltweiten Kapazitäten für die Produktion von Biopolymeren 2014 bei ca. 1,7 Millionen Tonnen, wohingegen die globalen Kapazitäten für das Jahr 2019 auf knapp 7,85 Millionen Tonnen prognostiziert werden. Die prozentualen Marktanteile der einzelnen Biopolymere sind für das Jahr 2014 anhand der Gesamtkapazität in der Abbildung 1.1 dargestellt. Als die größten Markttreiber sind dabei das Bio-Polyethylenterephthalat (PET) 30, das Bio-Polyethylen (PE), bioabbaubare Stärkeblends, bioabbaubare Polyester und die Polymilchsäure (Poly-Lactic-Acid, PLA) zu erwähnen [5].

Prozentuale Marktanteile von Biopolymeren 2014 nach Kapazitäten (1,7 Millionen Tonnen)

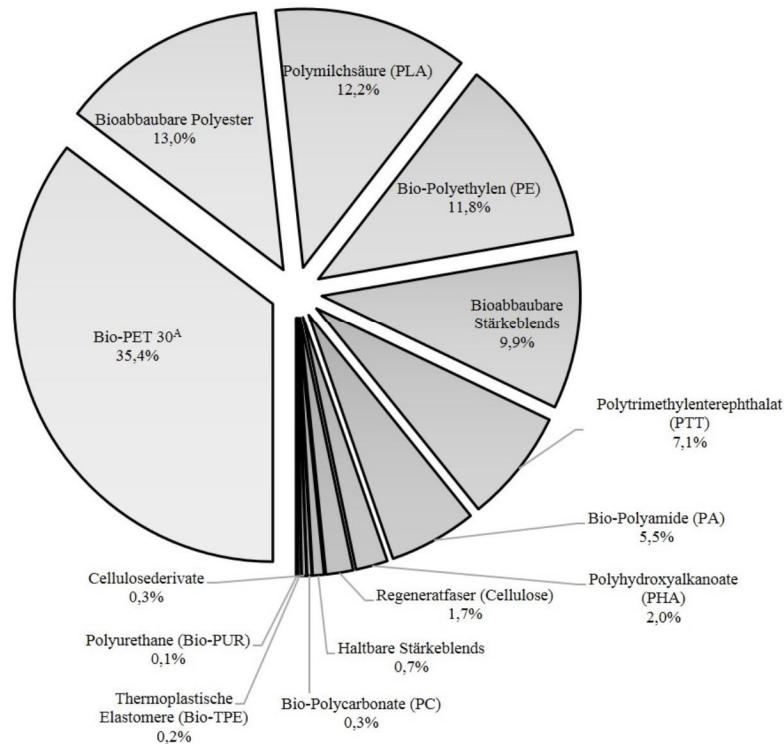


Abbildung 1.1: Darstellung der prozentualen Marktanteile von technischen Biopolymeren anhand der Daten von European Bioplastics, Institute for Bioplastics and Biocomposites, nova-Institute (2014) [5]. ^A Biobasierter Anteil von 30 %.

1.1.1 Bio-Polyethylen (PE) und Bio-Polyethylenterephthalat (PET)

Das größte Wachstumspotential bzw. die größten Marktanteile besitzen unter anderen Bio-PET 30 (35,4 %) und Bio-Polyethylen (11,8 %), wenngleich sich diese Polymere technisch nicht von ihren konventionellen, erdölbasierten Gegenstücken unterscheiden. Der Unterschied zu rein petrochemisch hergestellten Polymeren besteht in der Verwendung von Ausgangsstoffen, welche aus erneuerbaren Ressourcen gewonnen werden. Am Beispiel des Bio-PETs wird das Ethanol für den zur Fabrikation nötigen Ethylenglycol (EG) aus Zuckerrohr erzeugt, während sich der Terephthalsäure-Anteil (70 %) weiterhin auf Petrochemie stützt. Somit beträgt der biobasierte Anteil am Bio-PET 30 %. Im Falle des PEs kann die Ausgangsverbindung Ethylen zu 100,0 % aus Zuckerrohr generiert werden. Diese Art von Polymere werden auch als Drop-In-Lösung (nicht bioabbaubare Standardkunststoffe) bezeichnet [5, 6].

1.1.2 Bioabbaubare Stärkeblends

Bioabbaubare Stärkeblends besaßen im Jahr 2014 einen Marktanteil von 9,9 % [5]. Stärkeblends bestehen aus Thermoplastischer Stärke (TPS) und einer Kunststoffkomponente. Die TPS-Komponente wird aus Stärkegranulaten hergestellt. Stärke ist ein natürlich vorkommendes Biopolymer und eine der häufigsten Kohlenhydratquellen und diesbezüglich ein bedeutender nachwachsender Rohstoff. Jedoch

ist die industrielle Anwendung von natürlicher Stärke angesichts der Labilität gegenüber hohen Temperaturen, Gefrier-Auftau-Zyklen, der Eigenschaft Wasser aufzunehmen (Hygroskopie) und der schwachen Beständigkeit bezüglich Scherbelastung eingeschränkt. Daher wird die Stärke chemisch mittels Quervernetzung (Cross-linking) und Substitutionen (z.B. durch Acetylierung) modifiziert, um die funktionellen Eigenschaften zu verbessern [7]. Eine zweite Kunststoffkomponente bilden, zusammen mit der TPS, die Stärkeblends. Als Kunststoffe können zum Beispiel bioabbaubare Polyurethane (PUR), Polyvinylalkohole (PVA), Cellulosederivate, Polyesteramide und Polyester verwendet werden [8].

1.1.3 Bioabbaubare Polyester

Ein weiteres Segment mit 13 % Marktanteil bilden die bioabbaubaren Polyester [5]. Polyester sind strukturell und funktionell die vielseitigste Gruppe der polymerischen Materialien. Sie entstehen u.a. durch die Polymerisation von Dicarbonsäuren mit bifunktionellen Alkoholen oder Hydroxycarbonsäuren. Abhängig von den eingesetzten Monomeren und den Prozessbedingungen kann somit ein breites Spektrum an Polymereigenschaften, von z.B. flexibel bis rigide, erreicht werden. Darüber hinaus können die Polymere relativ einfach durch Hydrolyse der Esterbindung wieder in ihre monomeren Bestandteile zurückgeführt werden. Viele dieser Monomere können zudem biotechnologisch hergestellt werden und die Nutzbarkeit von agrarischen Reststoffen für deren Biosynthese ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Der zu 100,0 % biobasierte Polyester mit dem größten Wachstumspotential ist die Polymilchsäure (PLA), welche ein eigenes Marktsegment bildet [5, 9].

1.1.4 Polymilchsäure (PLA)

Der Marktanteil von PLA im Jahr 2014 betrug hinsichtlich der technischen Biopolymere 12,2 %. Bis 2020 wird eine Vervierfachung der Kapazitäten prognostiziert [5]. Dieses Wachstum kann unter anderem mit der Diversität der Anwendungsmöglichkeiten erklärt werden. So werden in der Medizintechnik beispielsweise prothetische Materialien aus PLA aufgrund ihrer guten Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit verwendet [10]. Ebenfalls wird PLA für medizinische Implantate wie Schrauben und Stifte eingesetzt. Weitere Anwendungsbereiche dieses Polyesters sind biokompostierbare Verpackungsmaterialien, Textilien und Plastikgeschirr [11]. PLA kann, wie in der Abbildung 1.2 illustriert, aus den beiden Enantiomeren der Milchsäure produziert werden [12]. Die Polymerisation wird aus (D,D- und/ oder L,L- oder *meso*-) Lactiden unter Zuhilfenahme von Organometallkatalysatoren mittels Ringöffnungspolymerisation (ROP) katalysiert [13, 14]. Alternativ kann Poly-D-Milchsäure (PDLA), Poly-L-Milchsäure (PLLA) oder Poly-D,L-Milchsäure (PDLLA) auch direkt durch Polykondensation der Monomere erhalten werden, obwohl hier das Molekulargewicht des Polymers durch das thermodynamische Gleichgewicht der Edukte (Milchsäure) und Produkte (PLA und Wasser)

limitiert wird [15].

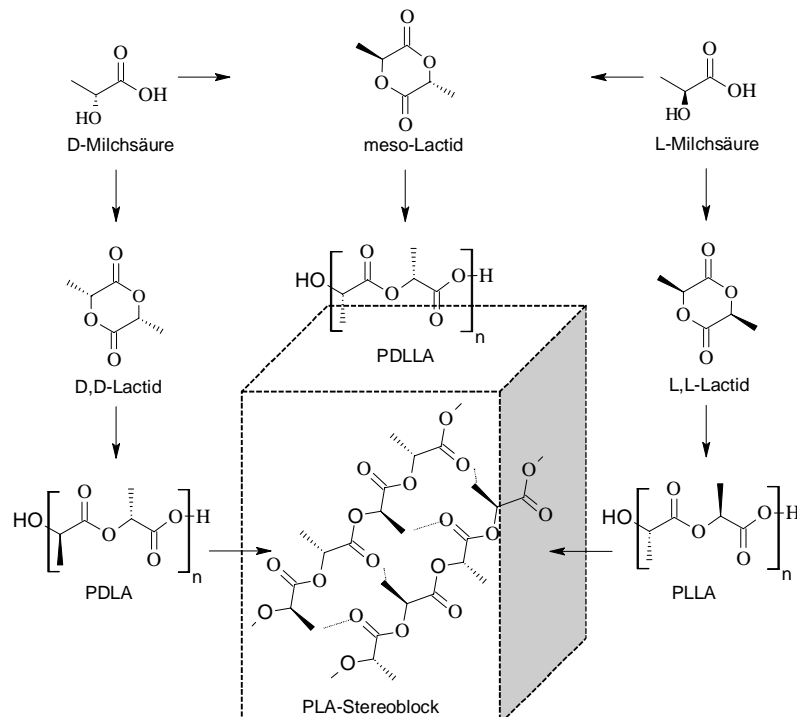


Abbildung 1.2: Generelle Syntheseroute des PLA-Stereoblocks ausgehend von den beiden Enantiomeren der (D- und L-) Milchsäure über die (D,D-/meso- und L,L-) Lactide hin zu den Homopolymeren PDLA und PLLA modifiziert nach Tsuji *et al.* (2005) [12].

Durch die Variation der Isomerenverhältnisse mittels Copolymerisation ergeben sich weitere Modifikationsmöglichkeiten, wenn auch die Schmelztemperaturen und Glasübergangstemperaturen zu vergleichsweise niedrigeren Werten tendieren als bei den optischen reinen PLLA und PDLA. Wenngleich das optisch reine PDLA und das PLLA einen ähnlichen Schmelzpunkt von ca. 175 °C aufweisen, so besitzt das PDLLA einen deutlichen niedrigeren Schmelzpunkt. Die Glasübergangstemperaturen der semikristallinen Homopolymere liegen zudem zwischen 50-65 °C. Dadurch sind PDLA und PLLA im Vergleich zum PET nicht so temperaturbeständig, wenn auch die mechanischen und physikalischen Eigenschaften ähnlich sind [16-19]. Ikada *et al.* (1987) konnte das Problem der Temperaturbeständigkeit durch die Entwicklung eines isotaktischen PLA-Stereoblock-Polymers aus PDLA und PLLA (1:1 Verhältnis) lösen, wodurch sich der Schmelzpunkt auf ca. 230 °C erhöht [20]. Der Grund für die verbesserten Eigenschaften des isotaktischen Stereoblock-PLAs ist die dichte polymerische Packung der kristallinen Bereiche. Die erhöhte Stabilität kann seitens der Summe der intermolekularen Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen der Methylgruppe und der Carbonylgruppe der entgegengesetzten homochiralen Polymerketten erklärt werden [21]. Aufgrund der mitunter erhöhten Temperaturbeständigkeit hat das isotaktische PLA-Stereoblockpolymer das Potential, die erdölbasierten Werkstoffe für Verpackungsmaterialien, im Elektronikbereich und in der Automobilindustrie zu ersetzen [19, 22].

1.2 Industrielle Produktion von Milchsäure und Marktsituation

Für die industrielle Erzeugung von L-Milchsäure hat sich schon im Jahre 1881 der biotechnologische Weg mittels Fermentation von Zuckern durch Mikroorganismen durchgesetzt. Zwar kann Milchsäure auch chemisch synthetisiert werden, aber diese Methode ist aufgrund des hohen Chemikalienbedarfs und des racemischen Endprodukts unvorteilhaft [23].

Des Weiteren wurde jüngst eine wissenschaftliche Arbeit veröffentlicht (Sharninghausen *et al.* 2014), die unter Zuhilfenahme von Organometallkatalysatoren die Konversion von Glycerin zu Milchsäure thematisiert. Hier ist es gelungen, L-Milchsäure stereoselektiv in einem homogenen, katalytischen Prozess mittels Iridiumkomplexen mit einer Selektivität von 95,0 % zu synthetisieren. Dennoch werden 90,0 % der weltweiten Milchsäureproduktion auf fermentativen Weg erreicht [24]. Wenn auch die chemischen, katalytischen Prozesse eine höhere Produktivität erzielen, so hat die fermentative Herstellung den Vorteil, dass eine Vielzahl an Kohlenstoffquellen von den Mikroorganismen genutzt werden können. So können z.B. Lactose, Stärke, Maltose oder auch Saccharose, Glucose und Fructose aus Melassen zur Konversion zu optisch reiner Milchsäure verwendet werden, wodurch ein breites Spektrum an Ersatzstoffen flexibel, je nach Marktsituation, eingesetzt werden kann [25-28]. Nichtsdestotrotz müssen noch prozesstechnische Probleme überwunden werden, um PLA langfristig konkurrenzfähig zu machen.

Ein Nachteil für die generelle Substitution der herkömmlichen, (teils) petrochemischen Polymere ist momentan der Preis für PLA-Materialien. Während beispielsweise die Preisspanne für Bio-PET 30 zwischen 1,9-2,2 Euro/kg im Jahr 2015 lag [29], so ist die Preisspanne für PLA deutlich größer. Die Ursache hierfür ist, dass zwischen Produkten auf der Grundlage von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) und GVO-freien Produkten unterschieden wird. Die Preisspanne von GVO-Produkten liegt zwischen 1,7-2,2 Euro/kg, wohingegen GVO-freies produziertes PLA mit einer Preisspanne von 2,0-4,0 Euro/kg verkauft wird [30, 31].

Ein weiterer Anlass für die große Preisvariabilität ist, dass es bisher noch kein etabliertes industrielles Verfahren für die Herstellung des D-Isomers der Milchsäure gibt und es in der Produktion mit Standardlaborchemikalien deutlich teurer ist als die L-Milchsäure basierend auf Ersatzstoffen [32]. Konsequenterweise ist so das PDLA deutlich teurer als das PLLA-Homopolymer. Jedoch hat der PLA-Hersteller Cellulac mit dem Bau einer Fabrik (Kapazität: 20 kT/Jahr) in Irland begonnen, in der beide Isomere der Milchsäure auf der Basis agrarischen Reststoffen produziert werden sollen. Somit wäre diese Fabrik die weltweit größte für die Produktion für D-Milchsäure. Nach eigenen Angaben sollen sich zudem die Fabrikationskosten für D-Milchsäure um 40,0 % reduzieren [33]. Ungeachtet dessen wird weiter an D-Milchsäure Biokatalysatoren geforscht, um den Herstellungsprozess effizienter zu gestalten (vergleiche Kapitel 1.3.1, Seite 6 folgende und Kapitel 1.4, Seite 13 folgende).

1.3 D-Milchsäure-Biokatalysatoren

Für eine industrielle Applikation müssen die Mikroorganismen (MO) verschiedene Voraussetzungen erfüllen. So muss die D-Milchsäure mit einer hohen optischen Reinheit, mit einer hohen Ausbeute, einer hohen Produktivität und in einer kurzen Fermentationsdauer mit Hilfe von Ersatzstoffen herstellbar sein. Neben Bakterien werden auch Hefen auf ihre Eignung zur D-Milchsäureproduktion untersucht. Generell können diese Biokatalysatoren nach gentechnisch veränderten Organismen (GVO) durch Metabolic-Engineering, konservative Mutanten und Wildtyp-Organismen differenziert werden.

1.3.1 Metabolic Engineering

Mit Hilfe der Gentechnik bzw. des Metabolic-Engineering können einerseits Mikroorganismen, die natürlicherweise kostengünstige Substrate verwerten können, durch genetische Modifikationen dazu gebracht werden, D-Lactat zu synthetisieren. Umgekehrt können auch D-Lactat produzierende MOs genetisch so angepasst werden, dass sie anschließend alternative Substrate zur Biokonversion nutzen können, die durch den Wildtyp-Stamm zuvor nicht zugänglich waren [34]. Eine Zusammenstellung der GVOs mit den größten Potentialen hinsichtlich der genannten Parameter ist in der Tabelle 1.1 aufgelistet. So sind zum Beispiel viele Wildtyp-Stämme nicht dazu in der Lage die C5-Zucker (Pentosen) der Hemicellulose aus Lignocellulose zu metabolisieren [35]. Darüber hinaus muss das Ausgangsmaterial meist noch enzymatisch oder chemisch aufgeschlossen werden, damit die Zucker bioverfügbar werden. Dieser Aufschluss erfolgt meist in höheren Temperaturbereichen, die suboptimal für die Biokatalysatoren sind.

Methoden, in denen die Substrathydrolyse und die eigentliche Fermentation getrennt voneinander ablaufen, werden auch SHF-Prozess genannt (Seperate Hydrolysis and Fermentation). Favorisiert wird aus Kostengründen der SSF-Prozess (Simultaneous Saccharification and Fermentation), da hier beide Schritte simultan stattfinden [28]. Aus diesem Grund hat Wang *et al.* (2011) *Bacillus coagulans* P4-102B, welcher Pentosen sowie Hexosen verwertet und bei 50 °C wächst, gentechnisch manipuliert, so dass der veränderte Stamm (QZ19) D-Lactat in hoher Konzentration (99,8 g/l) und mit einer hohen Ausbeute (96,0 %) produzieren kann. Dies ist möglich, indem die Gene für die L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH) und die Acetolactat-Synthase (ALS) ausgeknockt werden. Zudem wurde die Glycerin-Dehydrogenase (GlyDH) des Stammes so verändert, das Pyruvat zu D-Lactat umgesetzt werden konnte [36].

Tabelle 1.1: Gentechnisch veränderte Organismen (GVO) für die D-Lactatproduktion mittels Metabolic-Engineering und Ergebnisdaten der Fermentationsexperimente und Substrate.

Mikroorganismus/ Genetische Modifikationen	Substrate	D-Lactat [g/l]	Ausbeute [%]	Produktivität [g/(l·h)]	Optische Reinheit [% ee]	Fermentations- dauer [h]	Quelle
<i>Bacillus coagulans</i> QZ19 (Δ ldh and Δ alsS)	Glucose/ LB-Medium	99,8	96,0	1,39	-	72	[36]
<i>L. plantarum</i> NCIMB 8826 (Δ ldhL1::PxylAB- Δ xpk1::tkt- Δ xpk2::PxylAB)	Hartholz- Zellfasern/ MRS- Medium (HE/FE)	102,3	87,9	2,29	99,2	-	[37]
<i>Corynebacterium</i> <i>glutamicum</i> (Δ ldhA/pCRB204)	Glucose/ Mineral- salze	120,0	87,0	4,00	99,9	30	[38]
<i>Escherichia coli</i> HBUT-D (Δ pflB Δ frdABCD Δ adhE Δ pta Δ aldA Δ cscR)	Glucose/ NBS- Medium/ HE	127,0	97,0	6,35	99,5	20	[39]
<i>Escherichia coli</i> CICIM B0013-070B (ldhAp::kan-cl(ts)857- p(R)-p(L))	Glucose/ Mineral- salze	122,8	-	4,32	-	28	[40]
<i>Escherichia coli</i> BLac-2106	Rohglycerin / NBS- Medium	105,0	86,7	2,60	99,9	40	[41]
<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> (Δ dhaT Δ yqhD pBAD18-ldhA)	Glycerin/ Mineral- salze/ HE	142,1	82,0	2,96	~100	48	[42]
<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> JHY5330 (D-ldh dld1 Δ jen1 Δ adh1 Δ gpd1 Δ gpd2 Δ pdcl Δ (haploid))	Glucose/ YPD- Medium (HE/ Pepton)	112,0	80,0	2,20		51	[43]

Die Angaben der Ausbeuten sind zur einheitlichen Darstellung in Prozent wiedergegeben.

Einen ähnlichen Ansatz verfolgt auch Hama *et al.* (2015). Unter der Verwendung des *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 (L-LDH-Defizienz) Stammes ist es gelungen, delignifizierte Hartholz-Zellfasern als Kohlenstoffquelle in einem SSF-Prozess für die D-Lactatproduktion zu verwenden. Dabei konnte eine D-Lactatkonzentration von 102,3 g/l mit einer optischen Reinheit von 99,2 % erreicht werden. Die Besonderheit hier ist, dass es sich bei diesem Stamm eigentlich um einen heterofermentativen Organismus handelt. Aber durch die gezielte Disruption von Genen des Phosphoketolase-Stoffwechsels (*xpk1* und *xpk2*) und durch nachträgliche Integration des Xylose-Assimilationsoperon (*xyxAB*) und des Transketolase-Gen (*tkt*), kann dieser Stamm sowohl Pentosen (Xylose) als auch Hexosen (Glucose) homofermentativ nutzen [37].

Weiterhin bietet die gentechnische Veränderung von *Corynebacterium glutamicum* und *Escherichia coli* Stämmen den Vorteil, dass für die Fermentation auf teure Stickstoffquellen, wie Hefeextrakt (HE),

Fleischextrakt (FE) und Pepton verzichtet werden kann, da diese MOs grundsätzlich auf einem Mineralsalzmedium wachsen können. Durch das Einbringen einer D-Lactat-Dehydrogenase (D-LDH) in diese MOs ist es zudem möglich, alternative Substrate, wie z.B. Rohglycerin zu D-Lactat zu konvertieren [38-41]. Auch ist es durch gentechnische Veränderung von *Klebsiella pneumoniae* möglich, D-Lactat mit Glycerin und Mineralsalzmedium zu produzieren. Jedoch musste in diesem Fall Hefeextrakt zugesetzt werden, um eine Produktkonzentration von 142,1 g/l mit einer Gesamtproduktivität von 2,96 g/(l·h) zu erzielen [42].

Neben Bakterien sind auch Hefen im Fokus der Metabolic-Engineering-Konzepte. Im Vergleich zu *E. coli* und *C. glutamicum* besitzen Hefezellen ähnlich niedrige Ansprüche hinsichtlich der Stickstoffquelle. Zusätzlich tolerieren Hefen niedrige pH-Werte, womit sich der Neutralisationsmittelverbrauch reduziert und Kosten in der Produktaufreinigung gespart werden können [35]. So hat z.B. Baek *et al.* (2015) den *Saccharomyces cerevisiae* Stamm CEN PK2-1C zuerst durch Genknockout für die Glycerin-3-Phosphate-Dehydrogenase (GPD), Alkohol-Dehydrogenase (ADH), Pyruvat-Decarboxylase (PDC), Monocarboxylat-Transporter 1 (JEN1) und der zelleigenen D-Lactat-Dehydrogenase (D-LDH1) modifiziert. Diese Veränderungen haben dazu geführt, dass der Stamm (JHY5330) weder Glycerin noch Ethanol produzieren kann. Außerdem kann die Zelle durch die Disruption der Gene *jen1* und *dld1* bei einer Substratlimitierung, keine organischen Säuren mehr aufnehmen und diese wieder zu Pyruvat umwandeln. Durch die letztendliche Integration einer D-Lactat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides* wird das Pyruvat aus der Glykolyse ausschließlich zu D-Lactat konvertiert, wobei eine Produktendkonzentration von 112,0 g/l mit einer Gesamtproduktivität von 2,20 g/(l·h) realisiert werden konnte [43]. Andererseits konnte bei diesen Experimenten nicht gänzlich auf komplexe Medienbestandteile, wie Hefeextrakt und Pepton verzichtet werden (siehe Tabelle 1.1).

1.3.2 Gentechnisch veränderte Organismen (GVO)

Innerhalb der Europäischen Union (EU) müssen GVO-Erzeugnisse bezüglich Lebens- und Futtermittel eine zentrales Prüf- und Zulassungsverfahren durchlaufen. Die Bewertung wird durch die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority, EFSA) durchgeführt. Eine Zulassung der GVO-Erzeugnisse ist nur gegeben, wenn ein Nachteil für Mensch, Tier und Umwelt kategorisch ausgeschlossen werden kann. Der Antragssteller ist hier in der Beweispflicht und muss einen Nachweis darüber bringen, dass die GVO-Produkte ebenso sicher sind, wie die konventionellen GVO-freien Erzeugnisse. Als Grundlage gilt die Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel [44]. Aus diesem Grund könnte es in der EU möglicherweise unrentabel sein, einen Prozess mit GVO zu etablieren, da der Fermentationsrest nicht unbedingt als Tierfutter verkauft werden kann und dadurch Extrakosten für die Entsorgung entstehen könnten. Gleichwohl ist auch die D-Lactatproduktion mit Wildtyp-Organismen oder konservativen Mutanten von

D-Milchsäurebakterien (D-Lactic-Acid-Bacteria, D-LAB) Gegenstand der aktuellen Forschung (siehe Kapitel 1.4).

1.3.3 D-Milchsäurebakterien (D-LAB) und Zuckermetabolismus

Neben der Biotechnologie sind *Lactobacillen* wegen ihrer Stoffwechseldiversität auch für die Nahrungsmittelindustrie sehr interessant. So sind sie in der Lage verschiedene Zucker zu metabolisieren, wie z.B. Disaccharide, Hexosen und Pentosen [45]. Angesichts dieser Tatsache werden die D-LAB anhand ihres Zucker-Metabolismus, analog zu L-LAB, als Heterofermentativ und Homofermentativ klassifiziert [46]. Eine Übersicht über die Stoffwechselwege (vereinfacht) bietet die Abbildung 1.3.

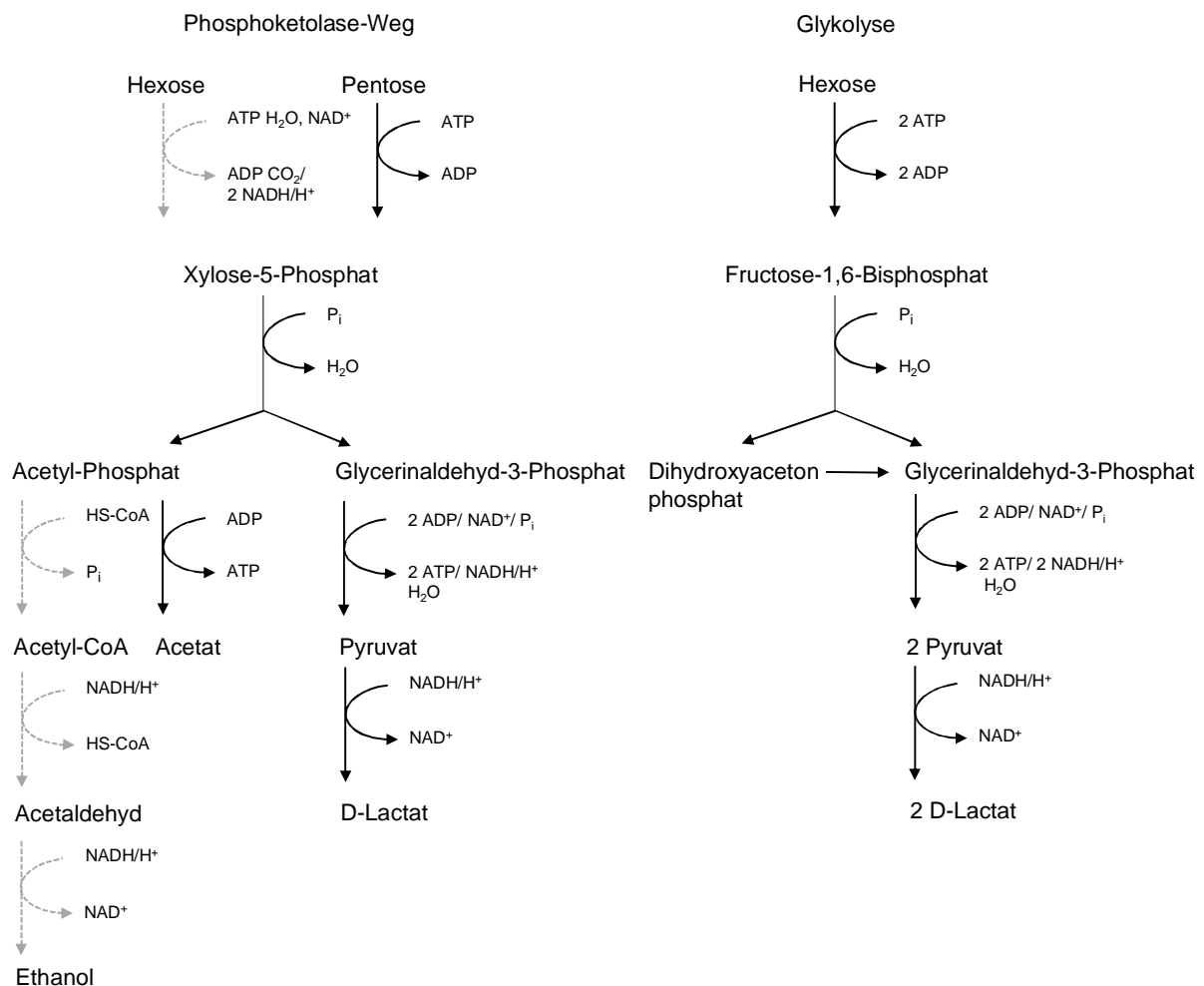


Abbildung 1.3: Vereinfachte Darstellung der Stoffwechselwege von D-Milchsäurebakterien. Phosphoketolase-Weg (links) und Glykolyse (rechts) [46,47, 49-51].

Heterofermentative D-LAB verwenden den Phosphoketolase-Stoffwechselweg (Abbildung 1.3 links), wohingegen homofermentative Vertreter ATP über die Glykolyse (Abbildung 1.3 rechts) bereitstellen. Mit Hilfe des Phosphoketolase-Wegs werden Pentosen unter Verbrauch eines Äquivalents ATP zu

Xylose-5-Phosphat isomerisiert. Das Xylose-5-Phosphat-Molekül wird anschließend durch das Enzym Phosphoketolase, unter Nutzung eines Phosphatmoleküls und der Freisetzung von Wasser, zu Acetyl-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat gespalten. Das Acetyl-Phosphat wird in einem weiteren Schritt zu Acetat umgesetzt werden, wobei ein Molekül ATP generiert wird. Das Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) wird wiederum durch den Gewinn von 2 Molekülen ATP und unter Zuhilfenahme von einem Äquivalent an NAD^+ zu Pyruvat konvertiert. Durch die darauffolgende Reduktion des Pyruvats mittels D-LDH und NADH/H^+ entsteht letztendlich ein Molekül D-Lactat. Steht eine Hexose (Abbildung 1.3 links, graugestrichelte Linie) als Substrat zur Verfügung, so unterscheiden sich die gebildeten Intermediate und Nebenprodukte im Stoffwechselweg von denen der Pentosen. Hexosen werden ebenfalls unter ATP-Verbrauch und durch die Reduktion von zwei Äquivalenten NAD^+ zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Acetyl-Phosphat gespalten. Das Glycerinaldehyd-3-Phosphat wird, wie zuvor schrittweise zu einem Molekül D-Lactat umgesetzt. Hingegen wird das Acetyl-Phosphat über Acetyl-CoA, zu Acetaldehyd und anschließend zu Ethanol reduziert, womit wiederum die anfangs zur Hexose-Spaltung nötigen 2 NADH/H^+ reoxidiert werden.

Die Unterschiede bei der Metabolisierung zwischen Hexosen und Pentosen spiegeln sich auch in der Energiebilanz wieder. So können netto 2 Moleküle ATP aus einer Pentose erzeugt werden, wenngleich die Konversion von einer Hexose nur zu 1 Molekül ATP führt [46, 47]. Des Weiteren sind auch fakultativ heterofermentative Spezies bekannt, die Pentosen heterofermentativ verwerten und Hexosen homofermentativ verstoffwechseln [48]. Im Gegensatz zu dem Phosphoketolase-Weg werden Hexosen in der Glykolyse unter Verbrauch von 2 ATP zu Fructose-1,6-Bisphosphat isomerisiert. Das Enzym Aldolase katalysiert im nächsten Schritt die Retro-Aldolreaktion von Fructose-1,6-Bisphosphat zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP). Eine Triosephosphat-Isomerase setzt das entstehende DHAP zu GAP um, wodurch bei der Konversion zu 2 Molekülen Pyruvat, insgesamt 4 ATP regeneriert werden und 2 NAD^+ reduziert werden. Die Reduktionsäquivalente werden anschließend bei der Reduktion der 2 Pyruvat-Moleküle zu D-Lactat reoxidiert und stehen somit im Stoffwechselprozess wieder zur Verfügung. Die homofermentative Umsetzung von Hexosen bringt den Bakterien einen Energiegewinn von 2 Mol ATP pro Mol Hexose und bedeutet für den Fermentationsprozess, dass 1 Mol Glucose (180,2 g/mol) theoretisch zu 2 Mol D-Lactat (90,1 g/mol) konvertiert werden können. Allerdings ist die Biosynthese von D-Lactat mit Hilfe von Pentosen durch die Glykolyse nicht möglich [46, 47, 49-51].

Aufgrund der theoretischen D-Lactatausbeute werden ausschließlich homofermentative Wildtyp-Stämme (oder konservative Mutanten) der Gattungen *Lactobacillus* und *Sporolactobacillus* auf ihre Eignung für die biotechnologische Herstellung von D-Lactat untersucht (siehe Kapitel 1.4). Beide Gattungen werden von der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) als sicher eingestuft. Sie sind grampositiv und bevorzugen mesophile Stoffwechseltemperaturen zwischen 20-45 °C, wobei auch einige

Lactobacillus Spezies bekannt sind, die ihr Temperaturoptimum bei 45 °C besitzen [52-54]. Die mesophilen Temperaturbedingungen werden in der Literatur oft als Nachteil diskutiert, da sie das Kontaminationsrisiko während des Fermentationsprozess erhöhen und ebenfalls SSF-Techniken schwer zu realisieren sind. Ein weiterer Nachteil ist die Kopplung zwischen bakteriellen Wachstum und der Produktion von D-Lactat. Wenngleich Energie in Form von ATP hauptsächlich über die Glykolyse generiert wird, so benötigen die Bakterien zur Reproduktion eine komplexe, kostenintensive Stickstoffquelle, Vitamine und Spurenelemente als Co-Faktoren für Enzyme in wichtigen Stoffwechselprozessen [54, 55].

1.3.4 Acetat-Metabolismus

Darüber hinaus besitzen Milchsäurebakterien neben dem Zuckerstoffwechsel noch weitere Möglichkeiten der Energiegewinnung. Heterofermentative Milchsäurebakterien generieren mittels Abbau von Pentosen, über die Spaltung von Acetyl-Phosphat zu einem Molekül Acetat, ein weiteres Äquivalent ATP (siehe Abbildung 1.3 links). Hingegen können einige homofermentative Stämme alternativ ein Molekül Pyruvat zu Acetat umsetzen, wobei ein zusätzliches Molekül ATP gebildet wird. Dies geschieht mit Hilfe des Phospho-Trans-Acetylase-Acetatkinase-Stoffwechselwegs (PTA-ACK-Weg). Der in drei Teilschritte untergliederte Stoffwechselweg ist in der Abbildung 1.4 skizziert.

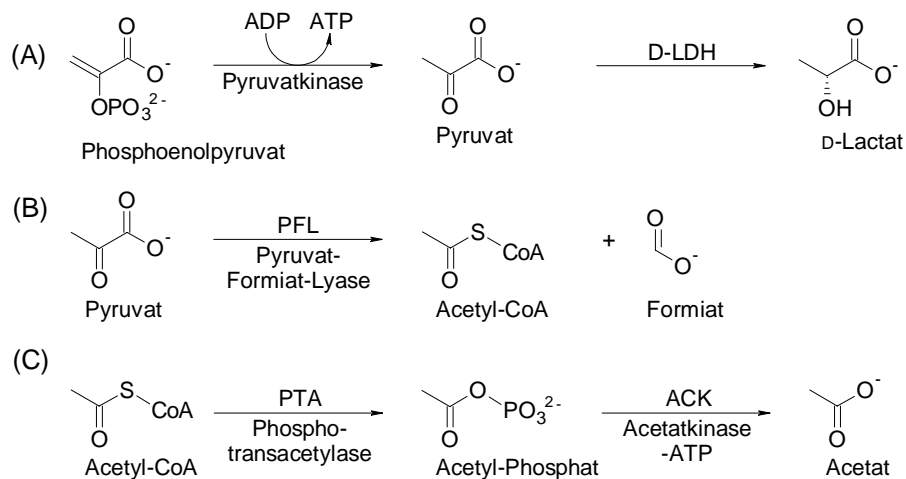


Abbildung 1.4: Phospho-Trans-Acetylase-Acetatkinase-Stoffwechselweg (PTA-ACK-Weg). (A) Konversion von Phosphoenolpyruvat zu D-Lactat. (B) Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und Formiat mittels Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL). (C) Umesterung von Acetyl-CoA mit Hilfe einer Phosphotransacetylase (PTA) und anschließende Dephosphorylierung durch eine Acetatkinase (ACK) zu Acetat.

Der Teilschritt (A) der Abbildung illustriert die Konversion von Phosphoenolpyruvat, über intermediäres Pyruvat zu D-Lactat in der Glykolyse. Alternativ zur Konversion von D-Lactat, kann im Teilschritt (B) unter anaeroben Bedingungen, das Pyruvat mit Hilfe einer Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) zu Acetyl-CoA und Formiat umgewandelt werden. Im Teilschritt (C) wird Acetylphosphat mit Hilfe

einer Phosphotransacetylase (PTA) aus Acetyl-CoA gebildet. Das Acetylphosphat kann darauf hin, unter Bildung von einem Äquivalent ATP, mit Hilfe der Acetatkinase (ACK) zu Acetat umgesetzt werden [56, 57]. Des Weiteren konnten Utrilla *et al.* (2012) und Koebmann *et al.* (2002) aufzeigen, dass das gebildete Acetyl-CoA und ATP die Aktivitäten der Enzyme der Glykolyse rückkoppelnd hemmen, was wiederum die D-Lactatproduktion beeinträchtigt [57, 58]. Da der PTA-ACK-Weg in vielen Organismen reversibel abläuft, kann er durch die Zugabe von Acetat in das Medium supprimiert werden [56, 59]. Liu *et al.* (2012) konnte verdeutlichen, dass die Zugabe Natriumacetat (NaOAc) in das Kultivierungsmedium zu einem erhöhten Glucoseverbrauch der Bakterien führt und letztendlich auch zur einer gesteigerten D-Lactatproduktion [59].

1.3.5 Energie-Recycling und Produktinhibierung

Des Weiteren können Milchsäurebakterien durch die Exkretion von Lactat und Protonen in das umgebende Medium Energie für den Stoffwechsel gewinnen. Die Abbildung 1.5 illustriert die Glucoseaufnahme der Zelle und die darauf anschließende Metabolisierung des Substrates zu 2 Molekülen Lactat, unter Generierung von 2 Molekülen ATP.

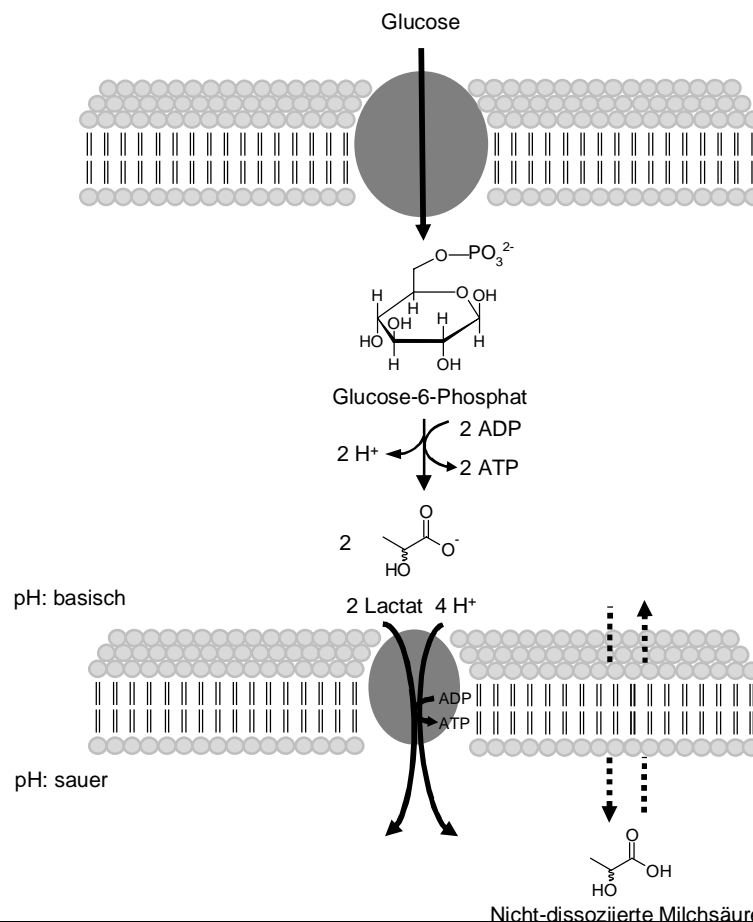


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Lactat-Exkretion und Produktinhibierung. Modifiziert nach [60-62].

Die weitere Energiegewinnung geschieht über einen sekundären Transportprozess, wobei Lactat-Ionen und Protonen, im stöchiometrischen Verhältnis 1:2, unter Zuhilfenahme eines Symporter-Proteins (ATPase) aus der Zelle ausgeschleust werden. Die Triebkraft dieses Prozesses ist dabei der elektrochemische Gradient zwischen dem Cytosol (basisch) der Zelle und dem extrazellulären Raum (sauer). Letztendlich kann mit Hilfe der protonmotorischen Kraft (Proton-Motiv-Force, PMF) ein zusätzliches Molekül ATP durch die Exkretion von 2 Lactat-Ionen und 4 Protonen gewonnen werden. Dieses Prinzip wird auch Energie-Recycling genannt [60].

Dieser Prozess kann aber nur unter optimalen Wachstumsbedingungen stattfinden. Fällt der pH-Wert des Mediums aufgrund der Lactatproduktion der Bakterien zu stark ab, so sinkt auch der intrazelluläre pH-Wert. Infolgedessen kann keine PMF mehr aufgebaut werden und das stöchiometrische Verhältnis von ausgeschleusten Lactat-Ionen (Lac^-) zu Protonen beträgt nur noch 1:1, wodurch keine zusätzliche Energie mehr erzeugt werden kann. Ein weiterer Effekt dieses pH-Abfalls ist, dass nun ein Teil des Lactats als nicht-dissoziierte Säure vorliegt. Im Gegensatz zu den Lac^- , welche die Zellmembran nicht durchdringen können, kann die nicht-dissoziierte Milchsäure (HLA) frei durch die Membran diffundieren. Konsequenterweise nimmt die Konzentration an nicht-dissoziierter Säure in der Zelle zu. Umgekehrt nimmt dadurch die Exkretion von Lac^- aus der Zelle ab [61].

Als weitere Folge kommt es auch zu einer Akkumulation von Pyruvat und zu sinkender NAD^+ -Regeneration, wodurch der Glykolysestoffwechsel gehemmt wird [62]. Letztendlich werden die Bakterien durch ihr eigenes Stoffwechselprodukt inhibiert. Um dem entgegenzuwirken, ist eine aktive pH-Steuerung für den Fermentationsprozess notwendig.

1.4 Biotechnologische D-Lactatproduktion mit agrarischen Reststoffen

Die experimentelle Validierung von geeigneten Supplinen für die entsprechenden D-Lactatproduzierenden MOs ist eine große Herausforderung. Da schätzungsweise bis zu 70,0 % der Gesamtproduktionskosten auf Rohstoffe für den Fermentationsprozess entfallen können, müssen günstige Ersatzstoffe gefunden werden, um die D-Lactatproduktion kosteneffizienter zu gestalten [54,55]. Altaf *et al.* (2007) zufolge gehen zudem allein 38,0 % dieser Rohstoffkosten auf teure Stickstoffquellen, wie Hefeextrakt zurück [63]. Ungeachtet dessen sind in den letzten Jahren einige Studien hinsichtlich der Nutzbarkeit von kostengünstigen Ersatzstoffen veröffentlicht worden, welche im Folgenden anhand der Tabelle 1.2 erläutert werden sollen.

Im Jahr 2013 konnte Nguyen *et al.* (2013) mit den Substraten Kurkuma (Gelbwurzel) als Kohlenstoffquelle und Sojabohnenmehl als Stickstoffquelle, in einem Batch-SSF-Prozess unter Zuhilfenahme des *Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600, aufzeigen, dass D-Lactat mit einer Konzentration von 91,6 g/l, einer Gesamtproduktivität von 2,08 g/(l·h) und einer optischen Reinheit von 99,5 % auf der Basis von agrarischen Reststoffen biotechnisch erzeugt werden kann. Jedoch konnte bei

diesen Experimenten, im Vergleich zu weiteren Studien, nur eine Ausbeute von 65,4 % erzielt werden [64].

Tabelle 1.2: Auflistung der Ergebnisdaten von Fermentationsexperimenten mit konservativen Mutanten und Wildtyp-Stämmen für die D-Lactatproduktion mit agrarischen Reststoffen.

Mikro-Organismus	Substrate	D-Lactat [g/l]	Ausbeute [%]	Produktivität [g/(l·h)]	Optische Reinheit [% ee]	Fermentationsdauer [h]	Quelle
<i>Lactobacillus coryniformis</i> ATCC 25600	Kurkuma/ Sojabohnenmehl	91,6	65,4	2,08	99,5	44	[64]
<i>Lactobacillus coryniformis</i> ATCC 25600	Süßkartoffel-Wurzeln/ HE/ Pepton	186,4	85,0	3,11	-	60	[65]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> HG 106	Reis-/ Weizenkleiehydrolysat	90,8	73,0	1,50	97,5	< 60	[66]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> JCM 1148	Zuckerohrmelasse	104,0	90,0	1,48	97,2	72	[67]
	Zuckerrohrsaft	118,0	95,0	1,66	98,3		
	Zuckerrübensaft	82,0	88,0	1,16	97,6		
<i>Sporolactobacillus inulinus</i> CASD	Glucose/ Erdnussmehl	207,0	93,0 ^B	3,80	99,3	54	[68]
<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i> DSM 442	Glucose/ Baumwolls.	144,4	96,0	4,13	99,3	38	[69]
<i>Sporolactobacillus</i> sp. Y2-8 ^A	Maismehl-hydrolysat/ HE	218,8	98,0 ^B	1,65	99,0	132	[70]
<i>Sporolactobacillus inulinus</i> NBRC 13595	Palmen-Rohrzucker/ Weizenproteinhydrolysat	189,0	94,0	5,25	>98,0	36	[71]

^A: Konservative Mutante. ^B: Die Ausbeute ist als Quotient des gebildeten D-Lactats und dem Gesamtzuckerumsatz berechnet. Die Angaben der Ausbeuten wurden hier zur einheitlichen Darstellung in Prozent wiedergegeben.

In einem Batch-SSF-Prozess, ebenfalls mit dem *Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600 durchgeführt, konnten Süßkartoffelwurzeln als Kohlenstoffquelle zu D-Lactat umgesetzt werden. Dabei konnte eine Produktkonzentration von 186,4 g/l, mit einer Gesamtproduktivität von 3,11 g/(l·h) und eine Ausbeute von 85,0 % erreicht werden. Dennoch mussten in diesem Experiment 7,0 g/l Hefeextrakt (HE) und 3,0 g/l Pepton eingesetzt werden, da ansonsten alternative Stickstoffquellen zu niedrigeren Ausbeutewerten oder zu einer Verlängerung der Fermentationsdauer geführt haben [65].

Zudem konnte Lu *et al.* (2009) mit dem *Lactobacillus delbrueckii* HG 106 als Biokatalysator, mittels SHF-Batch, Reishydrolysat als Kohlenstoffquelle zu D-Lactat umsetzen. Dabei konnte das Produkt mit einer Konzentration von 90,8 g/l, einer Ausbeute von 73,0 % und mit einer Produktivität von 1,50 g/(l·h) gewonnen werden. Aber auch bei diesen Experimenten musste Hefeextrakt (2,5 g/l) hinzugefügt

werden, da dem Weizenkleihydrolysat (29,1 g/l) und dem Reishydrolysat essentielle Wachstumsfaktoren fehlten [66].

Demgegenüber hat Calabia *et al.* (2007) die Nutzbarkeit von Zuckerrohrmelasse, Zuckerrohrsaft und Zuckerrübensaft als Kohlenstoffersatz für die D-Lactatproduktion untersucht. Das vielversprechendste Ergebnis dieser Experimente ist mit Zuckerrohrsaft als Kohlenstoffquelle erhalten worden. So konnte 118,0 g/l D-Lactat mit einer Gesamtproduktivität von 1,66 g/(l·h), mit einer Ausbeute von 95,0 % und einer optischen Reinheit von 98,3 % im Batch-Prozess produziert werden. Die niedrigeren Werte bezüglich der Ergebnisdaten mit Zuckerrohrmelasse und Zuckerrübensaft (siehe Tabelle 1.2) konnten auf eine zeitlich verzögerte Produktion der Bakterien im Fermentationsprozess zurückgeführt werden. Diese Produktionsverzögerung ist von den Autoren mit dem Vorhandensein von inhibitorischen Substanzen in den Ersatzstoffen begründet worden [67]. Ein Vorteil dieser Ersatzstoffe ist, dass sie keiner Vorbehandlung bedürfen und direkt eingesetzt werden können, da die enthaltenden Zucker für die Bakterien frei verfügbar sind.

In einer Publikation von Wang *et al.* (2010) ist speziell nach einem Ersatzstoff für Hefeextrakt geforscht worden. Mit dem *Sporolactobacillus inulinus* CASD und unter Zuhilfenahme von Erdnussmehl und Glucose als Substrate, konnte mittels Fed-Batch-SSF eine Produktkonzentration von 207,0 g/l, mit einer Gesamtproduktivität von 3,80 g/(l·h) und einer Ausbeute von 93,0 % erhalten werden [68]. Ein weiterer Artikel zu alternativen Stickstoffquellen ist 2013 veröffentlicht worden. So hat Li *et al.* (2013) unter der Verwendung des *Sporolactobacillus laevolacticus* DSM 442 und Baumwollsaamen als Stickstoffquelle, in einem Fed-Batch-SSF, eine D-Lactatkonzentration von 144,4 g/l, mit einer Gesamtproduktivität 4,18 g/(l·h) und einer Ausbeute von 96,0 % erhalten können. Laut den Autoren sind Baumwollsaamen ein kostengünstiges und quantitativ gut verfügbares agrarisches Restprodukt in China [69].

Auch die Kombination verschiedener Fermentationsmethoden werden zu Steigerung der Effizienz des Prozesses mit agrarischen Reststoffen untersucht. Unter Anwendung eines Fed-Batch-SHF-Prozesses konnte Zhao *et al.* (2014) Maismehlhydrolysat als Kohlenstoffersatz für die D-Lactatproduktion einsetzen. Mit Hilfe von immobilisierten Zellen (*Sporolactobacillus* sp. Y2-8) in einem Fibrous Bed Bioreaktor (FBB) konnte so eine Produktkonzentration von 218,0 g/l, mit einer durchschnittlichen Produktionsrate von 1,65 g/(l·h) und einer Ausbeute von 98,0 % erzielt werden [70].

Darüber hinaus ist ein Artikel zur Produktion von D-Lactat auf der Basis agrarischen Reststoffen mit dem *Sporolactobacillus inulinus* NBRC 13595 erschienen. Tadi *et al.* (2015) konnte im Batch-SHF mit Weizenproteinhydrolysat als Stickstoffquelle und Palmenrohrzucker (Palm-Jaggery-Rohrzucker, PJ) als Kohlenstoffquelle 189,0 g/l D-Lactat bei einer Fermentationsdauer von 36 Stunden produzieren. Ferner beträgt die Ausbeute 94,0 % und die Gesamtproduktivität 5,25 g/(l·h). Nach eigenen Angaben wurden die Prozesskosten, im Vergleich zur Fermentation mit Glucose und Hefeextrakt, um den Faktor 2,5 reduziert [71].

1.5 Neutralisationsmittel und Produktaufreinigung

Für die Wirtschaftlichkeit in einem industriellen Prozess ist der Anschaffungspreis des Neutralisationsmittels, die Kosten eines späteren Aufreinigungsverfahrens und gegebenenfalls anfallende Nebenprodukte des Aufreinigungsverfahrens von Wichtigkeit. Als Neutralisationsmittel für die biotechnologische D-Lactatproduktion erfolgreich getestete Chemikalien sind NaOH, KOH, $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CaCO_3 und Ca(OH)_2 [39, 72]. Während CaCO_3 und Ca(OH)_2 standardisiert, als kostengünstige Neutralisationsmittel für die Industrielle Lactatproduktion eingesetzt werden, so sind die Preise im Einkauf für NaOH und KOH höher [39, 73]. Wenngleich es für die Aufreinigung von Lactat mehrere Verfahren gibt, die Gegenstand der aktuellen Forschung sind, so existiert noch kein industriell etabliertes System zur Produktaufreinigung, welches den Einsatz dieser Chemikalien (NaOH und KOH) wirtschaftlich machen würde.

- Ein Verfahren, welches auf Adsorption beruht, ist die *in situ* Rückgewinnung von Lactat mittels Zeolithmolekularsieben aus der Fermentationsbrühe. Nachteile des Verfahrens sind eine geringe Regenerierbarkeit der Silikate von ca. 65,0 % und die geringe Adsorptionseffizienz des Lactats von < 50,0 % aus der Fermentationsbrühe [74].
- Weiterhin kann Lactat *in situ* auch durch Elektrodialyse mittels Ionenaustauschmembran aufgereinigt werden. Obgleich es bei diesem Prozess zu Membran-Fouling kommen kann und die Betriebskosten sehr hoch sind [75,76].
- Zusätzlich kann Lactat auch kontinuierlich durch eine Hohlfasermembran mit Hilfe von organischen Lösungsmitteln und aliphatischen Aminen extrahiert werden. Die Probleme bei dieser Reaktivextraktion sind die geringe Produktselektivität und die Toxizität des Extraktionsmittels bezüglich der Bakterien [77].

Das konventionelle Verfahren zur Aufreinigung von Lactat bei der Verwendung von CaCO_3 und Ca(OH)_2 als Neutralisationsmittel ist aufgrund des hohen Bedarfs an H_2SO_4 , der Nebenproduktbildung von CaSO_4 und Kalk nicht sehr umweltfreundlich. Im Gegensatz dazu hat Kasinathan *et al.* (2010) ein alternatives Aufreinigungsverfahren bzw. Syntheseverfahren für Ethyllactat ausgehend von Ammoniumlactat entwickelt [78]. Das Ethyllactat könnte mit Wasser hydrolysiert werden, um abschließend die Milchsäure zurückzugewinnen [76].

Die Abbildung 1.6 zeigt die beiden Verfahren im Vergleich. Bei der konventionellen Anwendung (Abbildung 1.6 oben) werden die Calcium-Ionen im ersten Schritt mit H_2SO_4 präzipitiert. Das Gips-Präzipitat wird anschließend durch Filtration entfernt. Da die Konversion von Calciumlactat zu Milchsäure bei Raumtemperatur und auch bei Überschuss an H_2SO_4 ca. 85,0 % beträgt, kann die gewonnene Milchsäure optional über einen Ionentauscher (IE) aufgereinigt werden. Das Wasser wird im nächsten Schritt aus der Calciumfreien Milchsäurelösung verdampft, um die Ausbeute der Gleichgewichtsreaktion von Ethanol (EtOH) und Wasser zu dem Produkt Ethyllactat zu erhöhen. Das Produkt kann letztendlich destillativ von den Edukten getrennt werden.

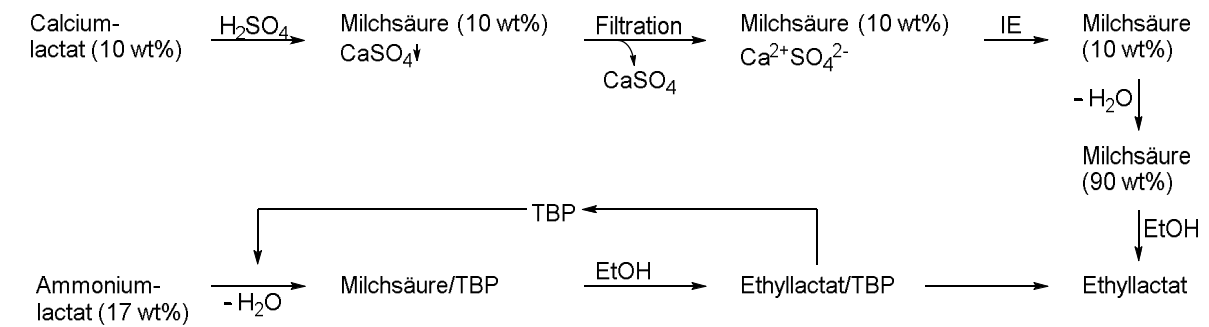


Abbildung 1.6: Vergleich der Aufreinigungsverfahren von Calciumlactat (oben) und Ammoniumlactat (unten). Nach Kasinathan *et al.* (2010) [78].

Demgegenüber wird bei der zweiten Aufreinigungsvariante (Abbildung 1.6 unten) die Ammoniumlactatlösung zuerst mit dem Extraktionsmittel Tributylphosphat (TBP) versetzt und das Wasser verdampft, wodurch die freie Säure zu 99,0 % erhalten wird. Im zweiten Schritt wird die Milchsäure mit Ethanol und unter Zuhilfenahme eines Katalysators (Amberlyst-36) verestert. Wie auch bei der konventionellen Methode kann das Ethylactat mittels Destillation aufgereinigt werden, wobei 78,0 % Konversion mit einer Selektivität von 95,0 % nach 10 Stunden realisiert werden konnte. Die zweite Aufreinigungsvariante bietet den Vorteil, dass keine Nebenprodukte gebildet werden und die eingesetzten Chemikalien wiederverwendet werden können. Zudem ist das Ammoniakwasser für den Fermentationsprozess in der Anschaffung relativ kostengünstig [39, 78].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Gegensatz für die biotechnologische Produktion von L-Lactat, gibt es noch kein industrielles Verfahren zur Herstellung von D-Lactat mit kostengünstigen Ausgangsrohstoffen. Daher ist das Ziel dieser Arbeit, ein Verfahren zur biotechnologischen Herstellung von D-Lactat auf der Basis von erneuerbaren Ressourcen, wie z.B. agrarische Reststoffe, zu entwickeln.

Für die Umsetzung dieses Ziels sollen zuerst entsprechende Biokatalysatoren ausgewählt werden, die die Fertigkeiten haben, D-Lactat in hoher Konzentration, Ausbeute und hoher optischer Reinheit zu produzieren. Des Weiteren sollen die ausgewählten Biokatalysatoren für die biotechnologische Anwendung charakterisiert werden. Dazu sollen zunächst allgemein die Kultivierungsbedingungen und wichtige physikalische Parameter, wie die optimale Stoffwechseltemperatur und der optimale pH-Wert für das Wachstum bestimmt werden. Ungeachtet dessen soll untersucht werden, welche kostengünstigen Neutralisationsmittel, wie z.B. Calciumcarbonat und Ammoniakwasser für den Prozess etabliert werden können.

Darüber hinaus soll ein Verständnis für die Biokonversion durch die Prozessoptimierung der Medienbestandteile gewonnen werden. So sind im Folgenden die im Hauptkulturmedium enthaltenden Stickstoffquellen sowie Spurenelemente und die Salze qualitativ und quantitativ auf ihre Relevanz für die Kultivierung getestet worden. Des Weiteren wird der Substrattoleranzbereich mit Hilfe verschiedener Glucosestartkonzentrationen für die Bakterien ermittelt und die zur D-Lactatproduktion nutzbaren Zucker sollen bestimmt werden. Anhand dieser Erkenntnisse sollen darauffolgend kostengünstige, in Deutschland verfügbare Ersatzstoffe auf ihre Eignung zur D-Lactatherstellung untersucht werden.

Weiterhin sollen Fermentationstrategien im Batch oder Fed-Batch entwickelt werden, um die Produktivität der Biokatalysatoren im Gesamtprozess zu optimieren. Zusätzlich soll die Möglichkeit der Zellimmobilisierung getestet werden, um die Prozessstabilität zu erhöhen.

Letztendlich soll aus der Kombination der gewonnenen Erkenntnisse ein kostengünstiger Fermentationsprozess auf der Grundlage von agrarischen Reststoffen zur Produktion von D-Lactat realisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Anmerkungen zu Chemikalien und Lösungen

Alle die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind mit dem höchstmöglichen Reinheitsgrad eingesetzt worden (p.a. grade). Zur Herstellung von Medien, Lösungen und Puffer ist konsistent Reinstwasser (MilliQ-Anlage mit Kohlenstofffilter, Merckmillipore) mit einem Widerstand von 18,2 M Ω ·cm bei 25 °C verwendet worden.

2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in der Tabelle 2.1 mit dem jeweiligen Lieferanten aufgelistet.

Tabelle 2.1: Alphabetische Liste der verwendeten Chemikalien und Lieferanten.

Chemikalien	Lieferant	Chemikalien	Lieferant
Ammoniakwasser	Sigma Ald.	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Arabinose D (-)	Fluka	Kaliumhydrogencarbonat	Merck
Arabinose L (+)	Sigma-Aldr.	Kobaltsulfat Heptahydrat	Merck
Biotin (Vitamin B ₇)	Sigma-Aldr.	Kohlenstoffdioxid	Linde/AirLiquide
Calciumcarbonat (gefällt)	Roth	Kupfersulfat Pentahydrat	Merck
Calciumcarbonat (gepulvert)	Roth	Lactat (D, DL, L)	Sigma-Aldr.
Calcium-Formiat	Merck	Lactose D (+)	Fluka
Calcium-Pantothenat (Vit. B ₅)	Sigma-Aldr.	Lentikat®Liquid	geniaLab
Carbol-Fuchsin	Fluka	Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck
Cyanocobalamin (Vit. B ₁₂)	Sigma-Aldr.	Maltose D (+)	Fluka
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck	Mangansulfat Hydrat	Merck
Eisen(II)sulfat Heptahydrat	Merck	Mannose D (+)	Fluka
Ethanol	Roth	Natriumacetat Trihydrat	Roth
Folsäure (Vit. B ₉)	Sigma-Aldr.	Natriumchlorid	Merck
Fructose D (-)	Fluka	Natriumhydroxid	Roth
Galactose D (+)	Fluka	Niacin (Vit. B ₃)	Sigma-Aldr.
Galacturonsäure D (+)	Merck	Pepton/ Trypton	Roth
Glucosamin D (+)	Fluka	Propionat	Merck
Glucose D (+) Hydrat	Roth	Pullulan	Sigma-Aldr.
Glycerin	Roth	Pullulan	Sigma-Aldr.
Hefeextrakt	Merck	Pyridoxin Hydrochlorid(Vit. B ₆)	Sigma-Aldr.
Inositol	Sigma-Aldr.	Raffinose D (+)	Fluka
Isomaltulose	Fluka	Rhamnose L (-) Hydrat	Sigma-Aldr.
Isopropanol	Sigma-Aldr.	Riboflavin (Vit. B ₂)	Sigma-Aldr.
Kaliumchlorid	Merck	Ribose D (-)	Fluka

Chemikalien	Lieferant
Saccharose	Fluka
Salzsäure (5-37 %)	Riedel de Häen
Schwefelsäure	Riedel de Häen
Sorbose L (-)	Fluka
Stickstoff	Linde/AirLiquide
Thiamin Hydrochlorid (Vit. B ₁)	Sigma-Aldrich
Trehalulose	Fluka
Trypton	Fluka
Vanadat-Molybdat-Reagenz	Hach Lange GmbH
Xylose D (+)	Fluka
Zinksulfat Heptahydrat	Riedel de Häen

2.1.2 Geräte/ Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte/ Materialien sind mit Typbezeichnung und Hersteller/ Lieferanten in der Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.2: Geräte/ Materialien mit Typbezeichnung und Hersteller/ Lieferanten.

Geräte/ Material	Typbezeichnung	Hersteller/ Lieferant
96-Well-Platten	350 µl	Sarstedt
Autoklav 23 L	DX-23	Systec
Autoklav 40 L	VX-40	Systec
Digitalkamera	XC 10	Olympus Soft Imaging Solution GmbH
Einwegspritzen	2 ml/ 5 ml/ 10 ml/ 20 ml	Braun
Eppendorfgefäße	1,5 ml/ 2,0 ml	Sarstedt
Falcontubes	15 ml/ 50 ml	Sarstedt
Megablock-96-Well	2,2 ml	Sarstedt
Mikroskop	Axioplan	Carl Zeiss
Parafilm	50 mm x 75 m	American National Can
Petrischale	Ø 145 mm	Greiner Bio-one
pH-Messkette	InLabMicro	Mettler Toledo
Photometer	T80 UV/VIS Spektrometer	PG Instruments Ltd.
Plattenreader	Fluostar Omega	BMG Labtech
Schüttler/ Inkubator	25 mm Auslenkung	HT Infors
Serologische Pipetten	5 ml/ 10 ml/ 20 ml/ 50 ml	Sarstedt
Sterilwerkbank	HeraSafe HS 18/2	Heraeus Instruments
Trockenschrank	UM 400	Memmert GmbH & Co KG
Vortex	Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG
Zentrifuge	Centrifuge 5417	Eppendorf
Zentrifuge	Biofuge Stratos	Heraeus Instruments

2.1.3 Medien und Lösungen

In der Tabelle 2.3 sind die Bestandteile des Vorkulturmediums (modifiziertes DSMZ-Medium 852, GYP (Glucose-Yeast-Peptone) Medium) mit den eingesetzten Konzentrationen aufgelistet. Alle Bestandteile, bis auf die Spurenelemente sind in den jeweiligen Konzentrationen in einer 1000 ml Schottflasche (mit Magnet-Rührkern) eingewogen worden. Die Komponenten wurden unter Rühren in Lösung gebracht. Im nächsten Schritt ist der pH-Wert entweder mit 5,0 M NaOH auf 6,2 oder mit 3,0 M H₂SO₄ auf 4,5 eingestellt worden. Danach wurde das Medium mit Wasser auf 990,0 g aufgefüllt und für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Zur Einstellung der finalen Konzentration des Mediums sind 10 ml der 100-fach konzentrierten Spurenelementlösung sterilfiltriert hinzugefügt worden.

Für die Hauptkultivierungen sind von den jeweiligen Medienkomponenten Stammlösungen hergestellt worden, um die Maillard-Reaktion oder weitere Nebenreaktionen der Bestandteile während des Autoklaviervorgangs grundsätzlich zu vermeiden (79). Um die Löslichkeit der Glucose bei hoher Massenkonzentration zu erhöhen, ist die Lösung zuvor für 30 min auf 70 °C im Wasserbad erhitzt worden. Danach ist die Glucoselösung unter Rührung für 2 h bei Raumtemperatur (RT) abgekühlt worden. Alle Stammlösungen bis auf die Spurenelementlösung und die NaOAc-Lösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.3 rechts) sind entweder mit 5,0 M NaOH auf einen pH-Wert von 6,2 oder mit 3,0 M H₂SO₄ auf pH 4,5 eingestellt worden.

Tabelle 2.3: Bestandteile (links) des Vorkulturmediums und (rechts) die Zusammensetzung der Spurenelementlösung. Modifiziertes GYP-Medium (Glucose-Yeast-Peptone, DSMZ-Medium 852).

Bestandteile des Vorkulturmediums	Konzentration [g/l]	Spurenelement-Lösung x 100	Konzentration [g/l]
Glucose·H ₂ O	20,0	MnSO ₄ ·H ₂ O	1,0
Hefeextrakt	10,0	Fe(II)SO ₄ ·7H ₂ O	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	NaCl	1,0
Spurenelemente	0,01	-	-

Die Lösungen wurden anschließend mit MilliQ-Wasser auf die entsprechenden Konzentrationen eingestellt und für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die Spurenelementlösung wurde hingegen in 100-facher Konzentration mittels Sterilfiltration, unter der Sterilwerkbank, in eine zuvor autoklavierte Schottflasche abgefüllt. Die Konzentrationen [g/l] der Stammlösungen und die Standardzusammensetzung des Hauptkulturmediums [g/l] sind in der Tabelle 2.4 aufgeführt. Weitere in dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen sind mit ihren jeweiligen Bestandteilen in der Tabelle 2.5 und der Tabelle 2.6 zusammengestellt.

Tabelle 2.4: Stammlösungen für die Hauptkultur und dessen Standardzusammensetzung. Modifiziertes GYP-Medium (Glucose-Yeast-Peptone, DZMZ-Medium 852).

Komponente	Konzentration [g/l]	Standardzusammensetzung [g/l]
Glucose·H ₂ O (~x 3)	500,0	150,0 <i>S. inul</i> 120,0- 130,0 <i>S.put.</i>
Hefeextrakt (x 20)	200,0	10,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O (x 10)	2,0	0,2
NaOAc	20,0	2,0
Spurenelementlösung (x100)	1,0	0,01

Tabelle 2.5: Lösungen und Puffer.

PBS-Puffer (Phosphate buffered saline) x 10 pH 8,0	Konzentration [g/l]	Vitaminlösung x 100	Konzentration [mg/100ml]
NaCl	80,0	Thiamin·HCl (Vit. B ₁)	10,7
KCl	2,0	Riboflavin (Vit. B ₂)	4,9
Na ₂ HPO ₄	14,4	Niacin (Vit. B ₃)	98,4
KH ₂ PO ₄	2,4	Ca-Pantothenat (Vit. B ₅)	23,7
Phosphatlösung x 100	Konzentration [g/l]	Pyridoxin·HCl (Vit. B ₆)	9,4
KH ₂ PO ₄	32,5	Biotin (Vit. B ₇)	0,2
K ₂ HPO ₄	32,5	Folsäure (Vit. B ₉)	5,8
		Cyanocobalamin (Vit. B ₁₂)	9,3
		Inositol	584,4

Tabelle 2.6: Lösungen der Sulfatsalze und Stammlösung der alternativen Kohlenstoffquellen.

Sulfatsalze von 3d-Metalle	Konzentration [g/l]
Co(II)SO ₄ ·7H ₂ O	2,8
Cu(II)SO ₄ ·5H ₂ O	2,5
Fe(II)SO ₄ ·7H ₂ O	2,8
MnSO ₄ ·H ₂ O	1,7
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,9

Alternative Kohlenstoffquelle (Hauptkomponente)	Konzentration [g/l]
Melasse 1 (Südzucker AG, Saccharose)	493,2
Melasse 2 (Südzucker AG, Saccharose)	439,2
Melasse 3 (Südzucker AG, Saccharose)	465,5
Melasse 4 (Südzucker AG, Saccharose)	456,9
Melasse 5 (Südzucker AG, Saccharose)	453,5
Melasse Beneo Carb S (Südzucker AG, Palatinose)	627,8
Melasse (Pray, Indien, Saccharose)	342,4
Zuckerrübenschnitzsaft (ZRDS Südzucker AG, Saccharose)	192,2

2.2 Organismen und Stammhaltung

In dieser Arbeit sind die beiden Stämme *Sporolactobacillus inulinus* DSM 20348 und *Sporolactobacillus putidus* DSM 21265 verwendet worden. Beide Stämme wurden als Lyophilisat von der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) aus Braunschweig kommerziell erworben. Die Stammhaltung ist durch Präparationen von Kryokulturen in 25,0 % (v/v) Glycerin bei -80 °C erfolgt. Die Kryokulturen dienten als Inokulum für die Vorkultivierung der Organismen.

2.2.1 Herstellung der Flüssigkultur

Für die Vorkultivierung der Bakterien sind 2 ml einer Kryokultur in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml Medium (siehe Tabelle 2.3) überführt worden. Für den *Sporolactobacillus inulinus* ist dabei das Vorkulturmedium mit pH 6,2 eingesetzt worden und für den *Sporolactobacillus putidus* betrug der pH des Mediums 4,5. Alle Arbeiten, wie das Ansetzen der Kultivierung sowie die Probennahme sind unter einer Sterilwerkbank durchgeführt worden. Die Inkubation der Organismen ist bei 35 °C ohne Rührung für 24 h erfolgt. Die Herstellung weiterer Flüssigkulturen erfolge mit 4,0 % Inokulum mit einer optischen Dichte bei 605 nm (OD_{605}) von 0,4 der Vorkultur (VK). Bei höheren oder niedrigeren OD_{605} -Werten der Vorkultur ist das Inokulationsvolumen entsprechend der Gleichung (2.1) angepasst worden.

$$\text{Inokulationsvolumen [ml]} = \frac{0,4}{OD_{VK}} \cdot x \text{ ml (4\%v/v)} \text{ (Gl. 2.1)}$$

2.2.2 Herstellung der Kryokulturen

Zur Herstellung der Kryokulturen sind die Vorkulturen in sterile 1,5 ml Eppendorfgefäße unter der Sterilwerkbank aliquotiert (jeweils 1 ml) worden. Anschließend wurden die Aliquots für 3 min mit 20800 g bei RT zentrifugiert. Unter sterilen Bedingungen wurden im nächsten Schritt jeweils 500 µl des Mediums abgenommen und verworfen sowie 500 µl 50,0 % (v/v) autoklaviertes Pharmaglycerin hinzugegeben. Im darauffolgenden Schritt sind die Zellpellets durch vorsichtiges Pipettieren resuspendiert worden. Nachfolgend sind jeweils 2 ml der Zellsuspension in ein steriles Kryogefäß überführt worden, welches bis zu weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert wurde.

2.3 Kultivierungsexperimente in Mikrotiterplatten

Experimente im Mikrotitermaßstab sind in dieser Arbeit zum einen für die Bestimmung der Optimaltemperatur der Bakterien gemacht worden. Zum anderen ist mit dieser Methode die Nutzbarkeit verschiedener Zucker untersucht worden. Dazu sind die einzelnen Reaktionsansätze (Medium siehe Tabelle 2.3 mit den Zusätzen 10,0 g/l Pepton und 2,0 g/l NaOAc) unter der Sterilwerkbank in einem

Volumen von 5 ml in Falcontubes (Sarstedt 15 ml) vorbereitet worden. Im weiteren Verlauf sind die äußeren Wells der 96-Well-Mikrotiterplatte (Sarstedt, Flachboden mit Deckel) A1-H1, A1-A12 und H1-H12 mit 350 µl Wasser befüllt worden, um eine mögliche Verdunstung in den Probenbereichen (von B3-G3 bis B11-G11) zu minimieren. Die Bereiche B3-G3 wurden mit 150 µl Medium (zellfrei) als Negativkontrolle befüllt. Außerdem dienten die Reihen B2-G2 als Leerwert (Blank) mit 150 µl Wasser, um gegebenenfalls bei einer Kontamination der Kontrolle eine Referenz zu den eigentlichen Messungen zu haben. Im letzten Schritt wurden die vorbereiteten Reaktionsansätze mit 4,0 % einer Vorkultur bei einer OD₆₀₅ von 0,4 angeimpft. Die Falcontubes sind homogenisiert (Vortexer) worden und die Ansätze sind in den Probenbereich mit 150 µl pipettiert worden. Das Pipettierschema hinsichtlich der Mikrotiterplatte ist in der Abbildung 2.1 illustriert. Der Deckel der Mikrotiterplatte ist daraufhin am Rand doppellagig mit Parafilm verschlossen worden. Nachfolgend ist das Wachstum der Bakterien anhand der OD₆₀₅ der Ansätze gegen die Negativkontrollwerte referenziert worden. Die Messungen wurden in einem Plattenreader (FLUOstar Omega, BMG Labtech GmbH) durchgeführt, indem in Intervallen von 30 min ein Messpunkt aufgenommen wurde. Zusätzlich wurde die Platte vor jedem Messpunkt bei 500 RPM (Rounds Per Minute) für 5 s geschüttelt, um falschen Messwerten durch Zellsedimentation entgegenzuwirken.

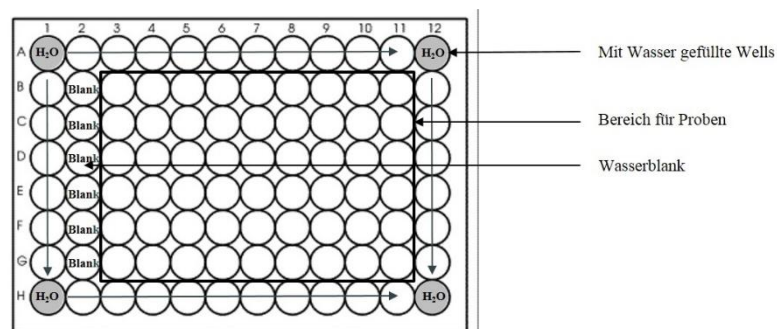


Abbildung 2.1: Generelles Pipettierschema bei der Kultivierung der Bakterien im 96-Wellmaßstab mit 150 µl Arbeitsvolumen mittels FLUOstar Omega-Plattenreader.

2.3.1 Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf das Wachstum der *Sporolactobacillus* Spezies

Zur experimentellen Bestimmung des Temperatureinflusses auf die Bakterien ist ein Temperaturbereich von 31-45 °C in zweier Inkrementen für beide Spezies untersucht worden. Das Heizsystem des Plattenreaders wurde ca. 30 min vor der Initiierung des Experiments eingeschaltet um die entsprechende Temperatur zu gewährleisten. Die Messungen sind über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt worden. Die Probenbereiche von B3-D3 bis B10-D10 dienten zur Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus* und die Bereiche von E3-G3 bis E10-G10 für die Ansätze hinsichtlich des *Sporolactobacillus putidus*. Die Wells B3-B4 bis D3-D4 und E3-E4 bis G3-G4 wurden jeweils als Negativkontrolle genutzt, wobei die Reaktionsansätze B5-G5 bis B10-G10 in 18 Repetitionen angesetzt worden sind. Für die

Auswertung der Ergebnisse wurde das arithmetische Mittel der OD₆₀₅-Werte zu den jeweiligen Messpunkten aus den Ansätzen bestimmt.

2.3.2 Untersuchung zur Nutzbarkeit unterschiedlicher Kohlenstoffquellen bezüglich der *Sporolactobacillus* Spezies

Für die Experimente zur Untersuchung der Kohlenstoffquellen sind zuerst Stammlösungen in einem Volumen von 20 ml in 50 ml Falcontubes (Sarstedt) in 10-facher Konzentration steril angefertigt worden. Die Reaktionsansätze wurden mit den in der Tabelle 2.7 angegebenen Konzentration der jeweiligen Kohlenstoffquelle unter der Sterilwerkbank in die 96-Well-Platte überführt. Die Messungen sind in Triplikaten über einen Zeitraum von 72 h bei einer Inkubationstemperatur von 38 °C durchgeführt worden.

Tabelle 2.7: Auflistung der getesteten Kohlenstoffquellen unter Angabe der eingesetzten Konzentrationen.

Spezifikation/ Anzahl der Kohlenstoffatome	Kohlenstoffquelle	Konzentration [g/l]
Aldose/ C-5	L-Arabinose	20,0
Aldose/ C-5	D-Arabinose	20,0
Aldose/ C-5	D-Xylose	20,0
Aldose/ C-5	D-Ribose	20,0
Aldose/ C-6	D-Glucose	20,0
Ketose/ C-6	D-Fructose	20,0
Aldose/ C-6	D-Galactose	20,0
Uronsäure/ C-6	D-Galacturonsäure	20,0
Aldose/ C-6	D-Mannose	20,0
Aldose/ C-6	L-Rhamnose	20,0
Ketose/ C-6	L-Sorbose	20,0
Aldose/ C-6	D-Glucosamin	20,0
Disaccharid/ C-12	Lactose	20,0
Disaccharid/ C-12	Saccharose	20,0
Disaccharid/ C-12	Isomaltulose	20,0
Disaccharid/ C-12	Trehalulose	20,0
Disaccharid/ C-12	Maltose	20,0
Trisaccharid/ C-18	D-Raffinose	20,0
Polysaccharid/ M _w = 10000	Pullulan	20,0

Die Probenbereiche von B3-D3 bis B11-D11 dienten zur Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus* und die Bereiche von E3-G3 bis E11-G11 wurden für die Reaktionsansätze des *Sporolactobacillus putidus* genutzt. Die Wells B3 bis D3 und E3 bis G3 wurden für die jeweilige Spezies als Negativkontrolle (zellfreies Medium) verwendet. Darüber hinaus sind die Wells B4 bis D4 und E4 bis

G4 als weitere Kontrollen genutzt worden, wobei diese Experimente mit Medium ohne Kohlenstoffquelle angesetzt worden sind. Im weiteren Verlauf wurden diejenigen Reaktionsansätze als negativ bewertet, deren OD₆₀₅-Werte gleich oder kleiner denen der Kontrollen ohne Kohlenstoffquelle gewesen sind. Die Ansätze deren OD₆₀₅-Werte größer waren als der Kontrollen ohne Kohlenstoffquelle sind als positiv bewertet worden. Infolgedessen sind nach 72 h Proben für die HPLC-Analyse genommen worden.

2.4 Kultivierung der Bakterien in Erlenmeyerkolben

Für die Kultivierung der Bakterien sind sterile 300 ml Erlenmeyerkolben (mit drei Schikanen) mit 100 ml Arbeitsvolumen (Medium siehe Tabelle 2.4 Standardzusammensetzung) verwendet worden. Zur Aufrechterhaltung des pH-Werts sind pro Kolben jeweils 60,0 g/l CaCO₃ (gefällt) eingewogen worden, welches zusammen mit den Kolben vor der Benutzung autoklaviert wurde (20 min bei 121 °C). Darüber hinaus sind die Kolben nach der Medienpräparation bzw. nach dem Animpfen der Kultur doppellagig mit Parafilm verschlossen worden um Wasserverdunstung während der Kultivierung zu verhindern. Die Kultivierung erfolgte im Doppelansatz bei 38 °C und 120 RPM Rührgeschwindigkeit. Für die begleitende Experimentalanalytik mittels HPLC zur Bestimmung der D-Lactatkonzentration, wurden über den Kultivierungszeitraum (96 h) Proben unter der Sterilwerkbank genommen. Modifikationen zu dieser Handhabung sind für die einzelnen Experimente in den folgenden Punkten aufgeführt.

2.4.1 Untersuchung zur Nutzbarkeit von Glycerin als Kohlenstoffquelle

Zur Untersuchung der Nutzbarkeit wurden zwei 30,0 % Stammlösungen (200 ml) hergestellt. Die Stammlösung für den *Sporolactobacillus putidus* wurde vor dem Autoklavieren auf pH 4,5 eingestellt und die Stammlösung für den *Sporolactobacillus inulinus* auf pH 6,2. Die Kultivierung für den *Sporolactobacillus inulinus* erfolgte mit 150,0 g/l Glycerin und 130,0 g/l für den *Sporolactobacillus putidus*. Als Kontrollen wurden jeweils zwei Ansätze mit Glucose für die jeweilige Spezies angesetzt (siehe 2.4).

2.4.2 Allgemeine Charakterisierung der *Sporolactobacillus* Spezies

Die Experimente für die allgemeine Charakterisierung der *Sporolactobacillus* Spezies sind in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml Arbeitsvolumen ohne Rührung (0 RPM) durchgeführt worden. Zur Untersuchung der Konversionseffizienz von Glucose zu D-Lactat sind für beide Spezies jeweils 100,0 g/l Glucose verwendet worden und die Inkubationen sind bei 35 °C für 13 d erfolgt. Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der D-Lactatproduktion und der Zunahme der bakteriellen Biomasse wurden mit 160,0 g/l Glucosestartkonzentration und bei 38 °C über einen Zeitraum von 19 d durchgeführt. In diesen Experimenten ist zusätzlich zur HPLC-Analyse, die OD₆₀₅ zu den

Probenahmepunkten gemessen worden.

2.4.3 Allgemeine Kultivierungsbedingungen für die *Sporolactobacillus* Spezies

Die vier Reaktionsansätze zur Untersuchung der allgemeinen Kultivierungsbedingungen sind für beide Spezies mit gefällten und gepulverten CaCO_3 (Roth) jeweils bei 0 RPM und 120 RPM realisiert worden. Für beide Spezies wurde eine Glucosestartkonzentration von 140,0 g/l vorgegeben. Die Kultivierungsdauer betrug für beide Spezies 168 Stunden.

2.4.4 Medienoptimierung/ Substrattests und Variation der Inokula

Für die Untersuchungen zur Substrattoleranz der *Sporolactobacillus inulinus* sind die Glucosestartkonzentrationen 100,0, 130,0, 140,0, 150,0, 160,0, 200,0, 230,0 und 270,0 [g/l] untersucht worden. Demgegenüber wurden für den *Sporolactobacillus putidus* die Konzentrationen 100,0, 120,0, 130,0, 150,0, 160,0, 200,0, 230,0 [g/l] eingesetzt (Medium, siehe Tabelle 2.4).

Für die Experimente zum Einfluss von verschiedenen Stickstoffquellen sind zusätzlich zu den Medienkomponenten in der Tabelle 2.4, Stammlösungen mit je 100,0 g/l von Trypton und Pepton/ Trypton angesetzt worden. Die pH-Werte der Lösungen wurden vor dem Autoklavieren (20 min bei 121 °C) für den *Sporolactobacillus inulinus* auf 6,2 eingestellt und für den *Sporolactobacillus putidus* auf pH 4,5. Zudem wurde der Stickstoffgehalt des eingesetzten Trypton und Pepton/ Trypton für die Experimente auf dem Stickstoffgehalt von 10,0 g/l Hefeextrakts (9,5 %) referenziert. Die initiale Glucosekonzentration betrug für den *Sporolactobacillus inulinus* 161,9 g/l und für den *Sporolactobacillus putidus* 122,1 g/l. Ferner sind die Optimalkonzentrationen des Hefeextrakts zur Kultivierung der *Sporolactobacillus* Spezies bestimmt worden. Bezüglich des *Sporolactobacillus inulinus* wurden Hefeextrakt-Startkonzentrationen 5,0, 7,0, 10,0, 20,0, 30,0 und 40,0 [g/l] (mit 168,2 g/l Glucose) getestet. Für den *Sporolactobacillus putidus* wurden die Konzentrationen 5,0, 7,0, 10,0 und 20,0 [g/l] gewählt (Glucosestartkonzentration 123,4 g/l).

Darüber hinaus ist der Einfluss von NaOAc auf die Kultivierung der Bakterien ermittelt worden. Für beide Spezies sind NaOAc-Konzentrationen (Hydratanteile mitberücksichtigt) 0,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 und 10,0 [g/l] im Kolben zusammen mit dem CaCO_3 (vor dem Autoklavieren) vorgelegt worden.

Des Weiteren sind die Einflüsse der Salzkomponenten/ Spurenelemente im Medium (siehe Tabelle 2.4) untersucht worden. Hinsichtlich beider Spezies wurde zunächst ein Kontrollexperiment mit allen Salzkomponenten, bestehend aus Magnesiumsulfat und den Spurenelementen, angesetzt. In einem weiteren Ansatz wurde unter Abwesenheit des Magnesiumsulfats gearbeitet und im dritten Ansatz ist auf die Spurenelemente verzichtet worden.

Die Substrate Zuckerrübenschnitzsaft (ZRDS), Beneo Carb S (Palatinosemelasse) und die Melassen 1-5 von der Südzucker AG, sowie eine weitere Melasse von Pray (Indien) sind im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Eignung als Erstazstoffe getestet worden. Die Melassen wurden aufgrund ihrer hohen Viskosität zuerst mit Wasser 2:1 (um ein Drittel) verdünnt. Der pH-Wert der Stammlösungen wurde vor dem Autoklavieren mit 15,0 % HCl auf 5,6 eingestellt, um die Lösungen für beide Spezies nutzen zu können. Darauf folgend wurde der Gesamtzuckergehalt der Substrate mittels HPLC bestimmt. Der Gesamtzuckergehalt der Lösungen ist in der Tabelle 2.6 aufgelistet. Die Substrate wurden mit einer durchschnittlichen Massenkonzentration von 150,0 g/l für den *Sporolactobacillus inulinus* und mit 132,0 g/l für den *Sporolactobacillus putidus* eingesetzt. Darüber hinaus wurden Experimente mit Glucose und Saccharose als Kohlenstoffquelle in äquivalenter Massenkonzentration zu den alternativen Substraten als Kontrollen durchgeführt. Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit der Saccharose bei höheren Temperaturen (Autoklavieren), wurde die Stammlösung (500,0 g/l, pH 5,6) vor den Ansätzen der Experimente frisch hergestellt und unsteril verwendet, da angesichts der Viskosität der Lösung eine Sterilfiltration nicht möglich war.

Ergänzend sind Untersuchungen zum Glucose- und Saccharosemetabolismus für den *Sporolactobacillus inulinus* durchgeführt worden. Das Experiment bestand aus vier verschiedenen Ansätzen. Der erste Ansatz diente als Kontroll-Experiment (1) mit 158,3 g/l Glucose, ein weiterer Ansatz (2) ist mit 93,1 g/l Glucose gestartet worden, im dritten Experiment (3) wurden 178,7 g/l Saccharose als Kohlenstoffquelle eingesetzt. Das vierte Experiment (4) bestand aus einem kompetitiven Ansatz mit 100,2 g/l Glucose und 89,2 g/l Saccharose. Die Kultivierung wurde über einen Zeitraum von 162 h durchgeführt.

Zur Variation der Inokula beider Spezies ist die Handhabung der Vorkultivierung modifiziert worden um entsprechend mehr Biomasse zu generieren. Die Vorkultivierungen sind in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml Arbeitsvolumen durchgeführt worden. Die Kolben wurden vor dem Autoklavieren mit 60,0 g/l CaCO_3 supplementiert. Danach wurde das Vorkulturmedium (Siehe Tabelle 2.3) jeweils mit 2 ml Kryokultur angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 38 °C und 175 RPM für 44 h. Insgesamt wurden für den *Sporolactobacillus inulinus* vier Hauptkulturen (Medium siehe Tabelle 2.4) mit verschiedenen Inokula prozessiert. Der erste Ansatz (OD 04 4%) ist mit vier Prozent (v/v) der Vorkultur bei einer OD_{605} von 0,4 als Inokulum (Referenz) angesetzt worden. Bei dem zweiten Experiment (OD 04 10%) wurde ebenfalls eine Vorkultur bei einer OD_{605} von 0,4 mit zehn Prozent Inokulum (v/v) verwendet. Der dritte Ansatz (OD 1 10%) wurde mit einem Inokulum (v/v) von zehn Prozent bei einer OD_{605} von 1,0 gestartet und das vierte Experiment (OD 2 10%) repräsentiert ein Inokulum (v/v) von ebenfalls zehn Prozent bei einer OD_{605} von 2,0. Für den *Sporolactobacillus putidus* entspricht der erste Ansatz (OD 04 4%) bei einer optischen Dichte von 0,4 und vier Prozent Inokulum (v/v) ebenfalls als Referenz. Das zweite Experiment (OD 1 10%) und der dritte Ansatz (OD 2 10%) sind jeweils mit zehn Prozent Vorkultur und einer OD_{605} von 1,0 bzw. von 2,0 angesetzt worden. Zudem sind

Untersuchungen zur Reaktionsführung mit CaCO_3 als Neutralisationsmittel und einem erhöhten Inokulum im Fed-Batch (FB) prozessiert worden. Das Experiment ist mit einer reduzierten Glucosestartkonzentration (79,7 g/l) bei CaCO_3 -Startkonzentration von 60,0 g/l durchgeführt worden. Das Inokulum für dieses Experiment betrug zehn Prozent einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 2,0. Der zweite Glucose-Feed mit 64,1 g/l und weiteren 30,0 g/l CaCO_3 ist nach 44 h erfolgt. Nach 72 h erfolgte der dritte Feed mit 68,7 g/l Glucose. Die Gesamtkultivierungsdauer betrug 139 h.

2.5 Herstellung von Lentikats[®] zur Immobilisierung des *Sporolactobacillus inulinus* und Repeated Batch

Der allgemeine Arbeitsablauf für die Herstellung der Lentikat[®]-Zellimmobilisate ist in der Abbildung 2.2 aufgezeigt. Zur Generierung von genügend Biomasse für die Zellimmobilisierung wurde zuerst eine mit 60,0 g/l CaCO_3 gepufferte Vorkultur (siehe Tabelle 2.3) für 48 h Stunden angesetzt.

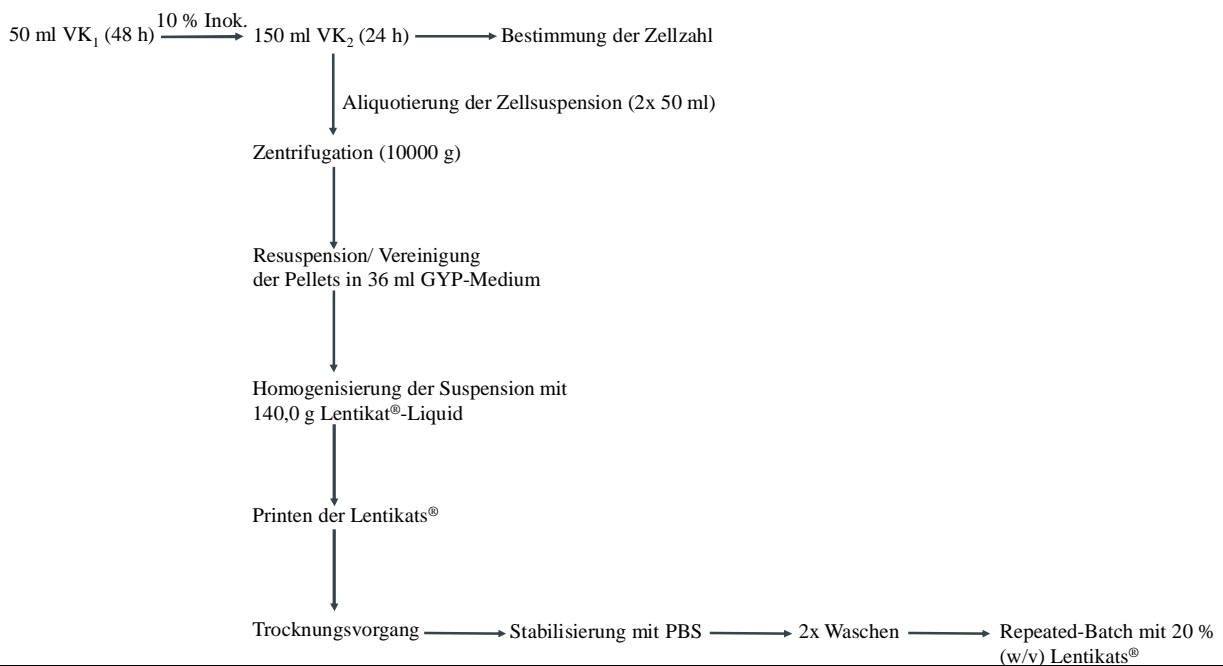


Abbildung 2.2: Arbeitsablauf für die Herstellung von Lentikats[®].

Im nächsten Schritt wurde eine weitere Flüssigkultur mit der Mediumzusammensetzung aus der Tabelle 2.4 vorbereitet. Allerdings wurde hier ein Arbeitsvolumen von 150 ml verwendet und das Inokulum betrug 10,0 % (v/v). Die Flüssigkultur wurde bei 38 °C mit 120 RPM für 24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurde die OD_{605} gemessen und die korrespondierende Zellzahl bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 2.3 aufgezeigt.

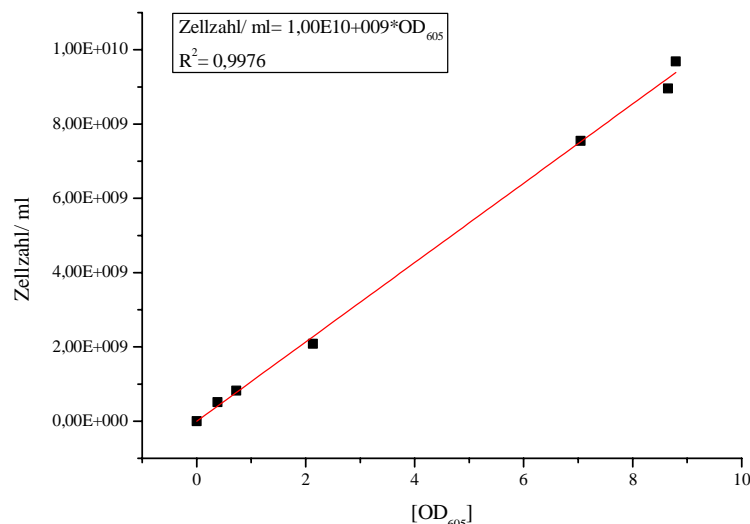


Abbildung 2.3: Korrelation zwischen der Zellzahl und der optischen Dichte (OD₆₀₅).

Als nächstes sind 100 ml der Zellsuspension steril in zwei 50 ml Falcontubes überführt worden. Die Zellen wurden anschließend für 10 min mit 10000 g bei 4 °C zentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments). Weiterhin wurde das Medium der Pellets verworfen und die Zellen der zwei Falcontubes (Sarstedt) wurden in 36 ml Vorkulturmedium vereint und resuspendiert. Währenddessen wurden 200,0 g Lentikat®-Liquid (GeniaLab, Braunschweig) in einer Mikrowelle bei 800 Watt erwärmt und zur Kühlung im Wasserbad für 15 min bei 38 °C gelagert. Daraufzufolgend wurden 140,0 g Lentikat®-Liquid mit den 36 ml Zellsuspension (Faktor 4:1 nach Herstellerangaben) in einem sterilen Becherglas mit Rührkern zusammengeführt und homogenisiert. Somit ergab sich eine Startbeladung von $5,78 \cdot 10^6$ Zellen/ mg Gel. Die Suspension wurde in eine Petrischale (Ø 145 mm) überführt. Mit Hilfe eines Lentikat®-Printer wurden ca. 400 Tropfen (Ø 3 mm) pro Print auf einen Petrischalendeckel mit bekannten Leergewicht gedruckt. Die bedruckten Petrischalendeckel wurden erneut gewogen und danach unter einem Abzug mit Ventilation bis zu 28,0 % der ursprünglichen Feuchtmasse getrocknet. Der Trocknungsvorgang wurde mit 1 x Phosphatpuffer (PBS, siehe Tabelle 2.5) gestoppt und die Immobilisate wurden in einem Becherglas mit Rührkern in PBS zusammengeführt und für 3 Stunden stabilisiert, wodurch die typische Linsenform entstand. Nach der Stabilisation wurde das PBS verworfen. Die Immobilisate wurden auf einem Sieb gesammelt und zweimal mit einer 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Im letzten Schritt wurden je 20,0 g Lentikats® (20,0 % w/v) auf entsprechend vorbereitete Erlenmeyerkolben (132,0 g/l Glucose, siehe Tabelle 2.4 und Kapitel 2.4) verteilt und im Repeated-Batch getestet. Die durchschnittliche Batch-Dauer über den gesamten Versuchszeitraum (Gesamtkultivierungsdauer 843 h) betrug 40 h pro Batch. Bis zu Batch 15 wurden nach 24 Stunden zusätzlich 30,0 g/l CaCO₃ (unsteril) dazu gegeben, da das Neutralisationsmittel zu diesem Zeitpunkt komplett verbraucht war. In den darauffolgenden Batch-Ansätzen wurde die Supplementierung mit 30,0 g/l CaCO₃ schon nach 16 h durchgeführt. Nach jedem Batch wurden die Immobilisate mit 0,9 % NaCl-Lösung (optional mit 0,9 % KCl-Lösung) von dem präzipitierten Calciumlactat befreit. Zur

Lagerung wurden die Lentikats[®] in 100 ml Vorkulturmedium (siehe Tabelle 2.3) mit 30,0 g/l CaCO₃ bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Die Visualisierung der Populationsdichte innerhalb der Linsen erfolgte mikroskopisch nach Herstellerangaben mit einer verdünnten Carbol-Fuchsin-Lösung (1:100) zur Zellfärbung (siehe Anhang, Abbildung 5.29, Seite 130).

2.6 Experimente zum Einfluss von Sulfat-Salzen der ersten Übergangsmetalle auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus* im Deep-Well/ Duetz[®]-System

Das Deep-Well/ Duetz[®]-System wurde genutzt um im Hochdurchsatz und zeiteffizient, Sulfat-Salze der ersten Übergangsmetalle für die Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus* zu testen. Dazu wurden alle Ansätze (mit 80,0 g/l Glucosestartkonzentration, 10,0 g/l Hefeextrakt und den entsprechenden Salzkomponenten) in einem 15 ml Volumen in 50 ml Falcontubes unter einer Sterilwerkbank vorbereitet. Die Ansätze wurden zur pH-Pufferung mit 60,0 g/l gepulverten CaCO₃ (Roth) supplementiert. Die Falcontubes wurden durchmischt, um die Suspension zu homogenisieren und 2 ml Reaktionsansatz in das jeweilige Well pipettiert. Ein Pipettierschema für die Deep-Well-Platte ist in der Abbildung 2.4 dargestellt. Die Reihen B2 bis G3 dienten als Positivkontrolle mit Medium der Standardzusammensetzung (Tabelle 2.4).

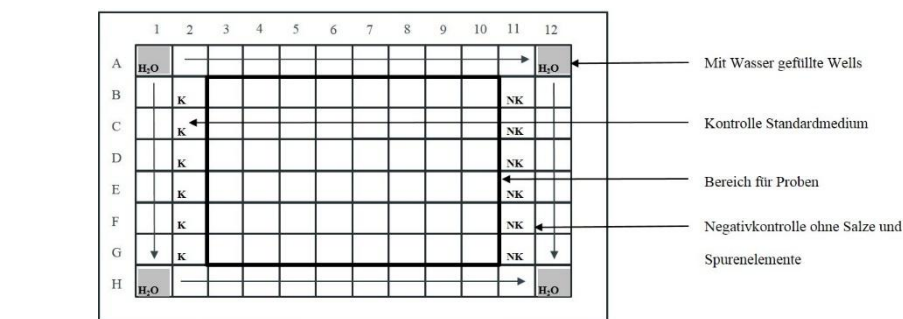


Abbildung 2.4: Pipettierschema zur der Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus* mit 2 ml Arbeitsvolumen in Deep-96-Well-Platten-System.

In dem Probenbereich B3-B10 bis G3-G10 sind die Sulfat-Salze (Cobalt-(II)-sulfat, Kupfer-(II)-sulfat, Mangan-(II)-sulfat, Zink-(II)-sulfat und Eisen-(II)-sulfat (siehe Tabelle 2.6 für die sterilfiltrierten Stammlösungen) der ersten Übergangsmetalle in Triplikaten mit je drei verschiedenen Konzentrationen (0,5 mM, 1,0 mM und 2,0 mM) getestet worden. Der Bereich B11 bis G11 wurde für die Negativkontrollen genutzt. Das Medium für die Negativkontrollen bestand aus dem Standardmedium (siehe Tabelle 2.4) ohne Salzbestandteile. Darüber hinaus sind die äußeren Wells (A1-H1, A1-A12, H1-H12 und A12-H13) der Platte mit 2,5 ml Wasser befüllt worden, um die Verdunstung in den Probenbereichen zu minimieren. Die Platte wurde nach der Präparation der Reaktionsansätze mit einer

Acetatfolie abgedeckt, um zum einen Kontaminationen zu verhindern und zum anderen den Gasaustausch durch das freiwerdende CO₂ mit der Umgebungsluft zu ermöglichen. Die Platte wurde folglich für einen Zeitraum von 68 h bei 38 °C ohne Rührung inkubiert. Hier ist anzumerken, dass über 68 h Inkubationsdauer zu einer Aufkonzentrierung des Produkts und Edukts aufgrund von Verdunstungseffekten (durchschnittlich 15,0 %) kam. Da die Daten für die Berechnung der maximalen Produktivität nach 48 h evaluiert worden sind, beträgt der Fehler durch Verdunstungen Ø 10,0 %.

2.7 Kultivierung im Bioreaktor (DASbox[®] Mini-Bioreaktor-System für die Mikrobiologie, Eppendorf) und Reaktionsparameteroptimierung

Die in dieser Arbeit verwendete DASbox[®] Mini Bioreactor-System bestand aus vier baugleichen Bioreaktoren, um reproduzierbare Reaktionsansätze im 100 ml Maßstab durchführen zu können. Der apparative Aufbau der Reaktoren ist in der Abbildung 2.5 schematisch skizziert. Das Reaktorsystem, ohne Medium und Elektroden, wurde vor jeder Benutzung für 20 min bei 120 °C autoklaviert. Die Ansätze wurden unter der Sterilwerkbank vorbereitet (Mediumzusammensetzung siehe Tabelle 2.4, ohne NaOAc).

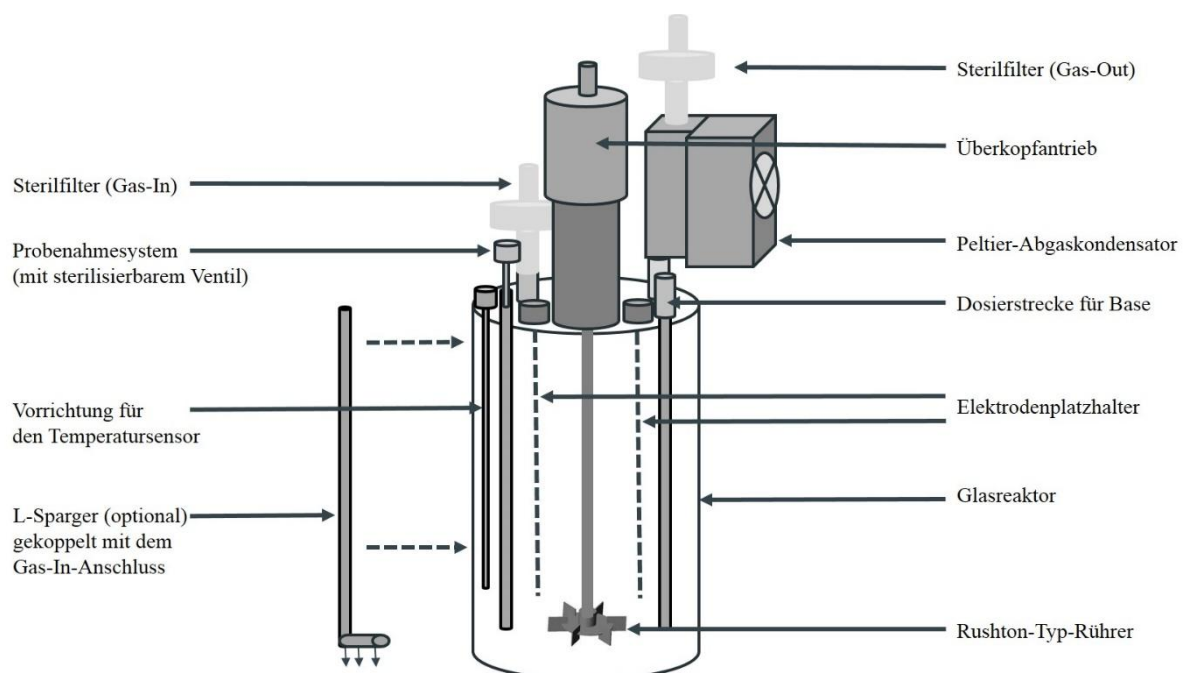


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung eines DASbox[®] Mini-Bioreaktor mit apparativen Aufbau.

Die pH-Elektroden (Mettler Toledo) wurden mit Pufferlösungen (Maßlösungen Roth) auf pH 7,0 und pH 4,0 kalibriert. Die Redox-Elektroden (Mettler Toledo) wurden mit Hilfe einer Silbernitrat-Kalibrierlösung überprüft. Die Kalibration erfolgte dabei mit der DASware-Control-Software. Die Elektroden wurden vor dem Einsetzen in den Reaktor mit Wasser gespült, mit 70,0 % (v/v) Ethanol oberflächendesinfiziert, noch einmal mit Wasser abgespült und in die entsprechenden Platzhalter (siehe

Abbildung 2.5) eingesetzt. Im nächsten Schritt wurden die Bioreaktoren an das Steuerungssystem der Anlage komponentenspezifisch angeschlossen. Infolgedessen wurde die Temperierung für die Reaktoren der Anlage auf 38 °C eingestellt und die Rührung auf 100 RPM gesetzt. Nach Erreichen der Solltemperatur wurde der pH-Wert des Mediums entsprechend auf pH 6,2 mit Ammoniaklösung justiert. Die Inokulation (4,0 % (v/v) bei einer $OD_{605} = 0,4$ der Vorkultur) der Reaktionsansätze erfolgte mittels steriler Einwegspritze. Im letzten Schritt wurde der pH-Sollwert der Reaktoren eingestellt und die Experimente wurden mittels Software gestartet. Abweichungen zu dieser Handhabung sind in den folgenden Punkten für die Experimente erläutert. Darüber hinaus sind weitere technische Daten in der Tabelle 2.8 aufgeführt.

Tabelle 2.8: Technische Daten bezüglich der DASbox® Mini-Bioreaktor-Anlage.

Technische Daten	DASbox® Mini Bioreaktor System für die Mikrobiologie (Eppendorf)
Parallele Bioreaktoren	4
Software	DASware-Control
Gefäße	Glas-Bioreaktoren
Arbeitsvolumina	60–250 mL (Glas)
Rührung	Überkopfantrieb
Rührer	Rushton-Typ (6-Blatt, AD 46 mm, ID 8 mm)
Rührgeschwindigkeiten	20–2.500 RPM (Glas)
Temperatur-Regelung	flüssigkeitsfreies Heizen und Kühlen (Peltier)
Temperaturbereich	10–60 °C bei 25 °C RT
Dosierstrecken/Gefäß	2 (Standard)
Standard-Flussraten (abhängig vom Schlauchdurchmesser)	0,3–9,5 mL/h bis 13–420 mL/h (Standard ID 2 mm)
Begasung	mit vier separaten massendurchflussgeregelten (TMFC) Kanälen, L-Sparger (D6, L 300 mm, W 63 mm), submers
Standard-Gasmischung	Luft, N ₂ , O ₂ und/oder CO ₂
Standard-Begasungsraten	0,2–25 slph, 0,2–18 slph CO ₂
pH-Regelung	Säure und/oder Base und andere
Redoxpotential-Messung	optional (Redox oder Füllstand)

Die Reaktionsansätze zur Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus* unter Schutzgasatmosphäre und mikroaeroben Bedingungen wurden mit einer Ammoniaklösung (3,4 molare NH₃-Lösung) als Neutralisationsmittel bei einem konstanten pH-Sollwert von 4,8 durchgeführt. Die Ansätze unter Schutzgasatmosphäre wurden mit trockenem Stickstoffgas (N₂), mit einer Rate von 0,25 slph begast (Standardgasraten siehe Tabelle 2.8). Die Gaszufuhr erfolgte submers über den in der Abbildung 2.5 skizzierten L-Sparger. Zudem wurden die Sauerstoffwerte im Medium während der Kultivierung mit Hilfe von Clark-Elektroden gemessen. Die Elektroden wurden zuvor im Kultivierungsmedium über Nacht (üN) nach Herstellerangaben polarisiert. Die Kalibration der Elektroden erfolgte vor dem

Start der Experimente mit 100,0 % Sauerstoffsättigung (O_2), 0,0 % N_2 -Sättigung und noch einmal bei 100,0 % O_2 -Sättigung. Des Weiteren wurden zum Vergleich Experimente ohne Schutzgasatmosphäre, unter mikraeroben Bedingungen, angesetzt.

Zur Untersuchung des Einflusses von CO_2 auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus* wurden vier verschiedene Experimente angesetzt. Zudem wurde die Begasungsrate für alle Ansätze auf 0,1 sL/h eingestellt.

- Ein Reaktionsansatz wurde mit 3,0 molarer NaOH als Neutralisationsmittel unter CO_2 -Atmosphäre durchgeführt.
- Ein zweiter Ansatz ist mit 3,0 molarer NaOH unter N_2 -Schutzgasbedingungen prozessiert worden.
- Des Weiteren wurde ein Vergleichsexperiment mit einer gesättigten Kaliumhydrogencarbonat-Lösung ($KHCO_3$) unter N_2 -Schutzgasatmosphäre durchgeführt.
- Das vierte Experiment wurde mit gesättigter $KHCO_3$ unter CO_2 -Atmosphäre angesetzt.

Der pH-Sollwert wurde ebenfalls auf 4,8 eingestellt. Die Kultivierung erfolgte bei 100 RPM und bei 38 °C im Hauptkulturmedium, ohne NaOAc (siehe Tabelle 2.4).

Für die Experimente zur Untersuchung des Einflusses des pH-Werts auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus* wurden die pH-Werte 4,8, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8 und 6,2 getestet. Um die Experimente untereinander vergleichen zu können, wurde als Startwert pH 7,5 mit einer 3,4 M Ammoniaklösung (6,3 %) für alle Ansätze eingestellt. Der jeweilig zu untersuchende pH-Wert wurde als Sollwert gesetzt, wo die Titration mit der NH_3 -Lösung starten sollte. Auf das Anlegen einer Schutzgasatmosphäre wurde bei diesem und für folgende Experimente verzichtet.

Für die Experimente zur Untersuchung des Einflusses des pH-Werts auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus putidus* wurden die pH-Werte 4,6, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6 und 5,8 getestet. Um die Experimente untereinander vergleichen zu können, wurde als Startwert pH 5,4 (für den Wert 4,6) oder 6,0 (für die Werte 5,0-5,8) mit einer 3,4 M Ammoniaklösung (6,3 %) für alle Ansätze eingestellt. Der jeweilig zu untersuchende pH-Wert wurde als Sollwert gesetzt, wo die Titration mit der NH_3 -Lösung starten sollte. Die Reaktionsansätze wurden zudem die ersten 24 h ohne Rührung kultiviert, danach ist die Rührgeschwindigkeit auf 100 RPM eingestellt worden.

Die Optimierung der D-Lactatproduktion im Bioreaktor ($CaCO_3$ als Neutralisationsmittel) für den *Sporolactobacillus inulinus* ist mittels Fed-Batch und mit unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten durchgeführt worden. Die Fed-Batch-Ansätze (FB1 und FB2) sind mit 10,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 2,0, mit 90,0 g/l Glucose und 60,0 g/l $CaCO_3$ gestartet worden. Die Rührgeschwindigkeiten sind für FB1 auf 750 RPM und FB2 auf 250 RPM eingestellt worden. Der zweite Feed ist bei dem Ansatz FB1 nach 28 h erfolgt, wobei hier 58,3 g/l Glucose und 15,0 g/l $CaCO_3$ zugeführt worden sind. Hingegen ist bei dem Ansatz FB2 der zweite Feed mit 71,6 g/l Glucose und

30,0 g/l CaCO_3 nach 40 h erfolgt. Die Gesamtkultivierungsdauer für FB2 betrug 90 h. Im Unterschied dazu ist das Experiment FB1 über eine Gesamtdauer von 50 h kultiviert worden, wobei die Rührgeschwindigkeit ab 44 h auf 1000 RPM erhöht wurde.

Zur Untersuchung der Reaktionsführung im Bioreaktor mit NH_3 -Lösung (*Sporolactobacillus inulinus*) als Neutralisationsmittel sind zum einen Ansätze im Batch-Experiment (B) mit 153,7 g/l Glucose durchgeführt worden. Zusätzlich zu den Batch-Ansätzen, sind Experimente mittels Fed-Batch (FB) bei einer Startkonzentration von 78,5 g/l Glucose gemacht worden. Die Rührgeschwindigkeit wurde auf 250 RPM eingestellt. Als Inokulum wurden jeweils 10,0 % einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 2,0 verwendet. Darüber hinaus ist bei diesen Experimenten eine 6,8 M (12,5 %) Ammoniaklösung verwendet worden um eine möglichst hohe Produktkonzentration zu erhalten. Zudem ist der Sollwert für die Titration auf pH 5,8 eingestellt worden. Für den FB-Ansatz erfolgte der zweite Glucose-Feed mit 48,0 g/l nach 20 h. Der dritte Feed wurde mit 39,0 g/l nach 41 h durchgeführt. Die Gesamtkultivierungsdauer betrug für das Fed-Batch-Experiment 89 h und für den Batch-Ansatz 90 h.

Für die Optimierung der D-Lactatproduktion im Bioreaktor sind pH-Shift-Experimente (*Sporolactobacillus inulinus*) bei einer Produktkonzentration von 20,0 g/l (Ansatz 1), 50,0 g/l (Ansatz 2), 60,0 g/l (Ansatz 3) und 70,0 g/l (Ansatz 4) durchgeführt worden. Dazu ist der pH-Sollwert zunächst auf 5,8 eingestellt worden und bei Erreichen der Produktkonzentration auf pH 6,5 (6,8 M Ammoniaklösung) erhöht worden. Ergänzend dazu, wurden zwei Kontrollen bei kontinuierlichen (Ansatz 5 und Ansatz 6) pH-Werten (5,8 und 6,5) als Referenz angesetzt. Darüber hinaus sind die Ansätze im Fed-Batch mit einer durchschnittlichen Glucosestartkonzentration von 93,0 g/l und mit einer Rührung von 250 RPM prozessiert worden. Infolgedessen wurde der zweite Feed mit durchschnittlich 51,0 g/l Glucose realisiert, wenn die residuale Zuckerkonzentration 10,0 g/l unterschritt. Die Gesamtprozessdauer betrug für die Ansätze (2) und (4) 51 h, wobei die Kultivierung bei den weiteren Experimenten nach 52 h beendet worden sind.

Die Experimente zur D-Lactatproduktion auf der Basis agrarischer Reststoffe sind zum einen mit Zuckerrübensüßsaft (ZRDS) als Kohlenstoffquelle und zum anderen mit einem Rapsschrothydrolysat (RS) als Stickstoffquelle realisiert worden. Der Rapsschrott ist vor der Anwendung enzymatisch mit der Endoprotease Protex™ 6L (Genencor International®) nach Herstellerangaben hydrolysiert worden. Dazu wurden zuerst 21,2 g Rapsschrott eingewogen und in 60 ml MilliQ-Wasser suspendiert. Im nächsten Schritt wurde der pH-Wert der Suspension unter Rühren auf 9,5 justiert. Folglich wurde die Suspension auf das finale Volumen von 100 ml eingestellt und 1,0 % Protease (v/w Substrat) hinzugegeben. Die Hydrolyse wurde bei 60 °C in einem Inkubator mit 100 RPM Rührung für 48 h durchgeführt. Nach Beendigung des Prozesses wurde der pH-Wert des Hydrolysats (pH 4,5) auf 6,2 rejustiert (mit 3,4 molarer NH_3 -Lösung) und bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

Die Experimente sind mit 20,0 % (w/v) Lentikats®-Immobilisaten (Aus den Repeated-Batch-Experimenten) des *Sporolactobacillus inulinus* in 100 ml Arbeitsvolumen prozessiert worden. Für die

Reaktionsansätze sind jeweils 10,0 g Rapsschrothydrolysat (21,2 g/l), entsprechend dem Stickstoffgehalt von 10,0 g/l Hefeextrakt (9,5 %), unter der Sterilwerkbank gravimetrisch dosiert worden. Zusätzlich wurden die Ansätze mit sterilfiltriertem 650,0 mg/l Phosphat und mit B-Vitaminen supplementiert (siehe Tabelle 2.5 für die Zusammensetzungen und Konzentrationen der Lösungen). Des Weiteren ist die Eisenstammlösung (Fe(II)SO₄·7H₂O, siehe Tabelle 2.6) jeweils frisch hergestellt worden, um die Oxidation der Fe(II)-Kationen zu vermeiden. Zudem wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen des Neutralisationsmittels (6,8 M und 13,4 M NH₃-Lösung) für die Kultiverungen getestet.

Die Experimente mit 6,8 M (12,5 %) Ammoniakwasser als Neutralisationsmittel wurden mit einer Saccharosestartkonzentration (ZRDS) von 178,9 g/l und 2,0 mM (0,556 g/l) Fe(II)SO₄·7H₂O im Batch über einen Zeitraum von 29 h kultiviert. Demgegenüber betrug die Prozessgesamtdauer bei den Ansätzen mit 13,4 M (25 %) Ammoniakwasser als Neutralisationsmittel 48 h, wobei eine Zuckerstartkonzentration von 184,0 g/l und 1 mM (0,278 g/l) Fe(II)SO₄·7H₂O vorgegeben wurden.

2.8 Analytik

In diesem Kapitel werden die verwendeten Methoden und Geräte, sowie die Gleichungen für Berechnung der auswertungsrelevanten Parameter beschrieben und erläutert. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit die Onlinedatenbank des Pathosystems-Resource-Integration-Centers (PATRIC) der Universität Chicago für Genomabgleiche mit den *Sporolactobacillus inulinus* CASD (www.patricbrc.org) genutzt.

2.8.1 Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) wurden die Zellen in 50 ml Falcontubes bekannten Gewichts mittels Zentrifugation (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments) bei 10000 g für 20 min (bei RT) vom Medium getrennt. Die pelletierten Zellen wurden darauffolgend zweimal mit einem Volumen Leitungswasser resuspendiert und erneut zentrifugiert (10000 g für 20 min). Die Pellets wurden anschließend bei 70 °C für 2 Tage im Trockenschrank getrocknet. Dabei erfolgt die Berechnung des BTM [g/l] durch die Subtraktion des Gewichts [g] des Falcontube mit getrocknetem Pellet (m_{pellet}) mit dem Leergewicht [g] des Falcontubes (m_{leer}). Dieser Wert wird folglich mit dem Volumen der Probe [l] dividiert (siehe Gleichung 2.2).

$$BTM = \frac{(m_{\text{Pellet}} - m_{\text{leer}})}{V} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

2.8.2 Bestimmung der Zellzahl und Mikroskopie

Für die Bestimmung der bakteriellen Zellzahl wurde eine Thoma-Zählkammer (0,02 mm·0,0025 mm²) verwendet. Unterzuhilfenahme eines Mikroskops (Axioplan, Carl Zeiss) wurden die Zellen im Phasenkontrast (40-fach Objektiv) gezählt. Dafür wurden 8 Großquadrate mit 16 Kleinquadraten der Thoma-Kammer ausgezählt. Für die Berechnung der Zellzahl wurde die Gleichung (2.3) verwendet. Die mittlere Zellzahl (\bar{n}) der gezählten Kleinquadrate wird mit dem Faktor tausend multipliziert und durch das Volumen [mm³] der Thoma-Kammer dividiert. Der errechnete Wert ergibt die Zellzahl pro ml.

$$\text{Zellzahl} = \frac{\bar{n} \cdot 10^3}{A \cdot h} \quad (\text{Gl. 2.3})$$

Darüber hinaus wurden weitere mikroskopische Untersuchungen im Phasenkontrast (20-fach, 40-fach und 100-fach Objektiv) mit Hilfe einer CCD-Digitalkamera (X10, Olympus) aufgenommen und mit einer Bildbearbeitungssoftware (analySIS 5.0, Soft Imaging System GmbH) ausgewertet.

2.8.3 Bestimmung der optischen Dichte (OD)

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) der Bakterienkulturen wurde mit einem T80 UV/VIS Spektrophotometer (PG Instruments Limited) realisiert. Die Proben wurden in einem Volumen von 1 ml in einer Standardplastikküvette (Schichtdicke= 10 mm, Sarstedt) vermessen. Dazu wurde zuerst ein VIS-Spektrum (λ = 400 nm bis 750 nm) des Vorkultivierungsmedium (siehe Tabelle 2.3) aufgenommen, um ein Minimum hinsichtlich der Eigenabsorption des Mediums über den Wellenlängenbereich bestimmen zu können. Ein Bereich mit der geringsten Absorption konnte ab λ = 605 nm beobachtet werden. Daher wurden die weiteren Messungen bei dieser Wellenlänge prozessiert. Die eigentliche Bestimmung der optischen Dichte der Bakterienkultur erfolge gegen eine Referenz (Blindwert) des Vorkulturmediums. Um einen linearen Messbereich sicherzustellen, wurden die Bakteriensuspensionen vor der Messung 1:1, 10-fach (1:9) und 20-fach (1:19) mit Vorkulturmedium verdünnt. Die Berechnungen der OD-Werte wurden mittels UVWin V5.0.5-Software (PG Instruments Limited) nach der Gleichung (2.4) durchgeführt.

$$OD_{605} = -\log_{10} \left(\frac{T_{605}}{100} \right) \cdot f \quad (\text{Gl. 2.4})$$

Die Absorption der Probe bzw. die optische Dichte bei 605 nm (OD_{605}) berechnet sich dabei aus dem negativen, dekadischen Logarithmus der Transmission bei 605 nm (T_{605}) multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor (f).

2.8.4 Berechnung der Produktivität

In dieser Arbeit wurde die Gesamtproduktivität als Maß für die Effizienz der D-Lactatproduktion für den Gesamtprozess verwendet. Der Prozess wurde als beendet betrachtet, wenn entweder das gesamte Substrat verbraucht war oder die Werte der aktuellen Produktivität gegen Null gingen. Die Gesamtproduktivität (P) in g/(l·h) wurde mit der Gleichung (2.5) errechnet. Dabei wird der Quotient aus der maximalen Produktkonzentration (β_{\max}) in g/l durch die Gesamtprozessdauer (t_{gesamt}) in Stunden (h) gebildet.

$$P = \frac{\beta_{\max}}{t_{\text{gesamt}}} \quad (\text{Gl. 2.5})$$

Des Weiteren wurde die maximale Produktivität auch der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien gleichgesetzt. Die maximale Produktivität (P_{\max}) in g/(l·h) gibt dabei die maximale gebildete D-Lactatkonzentration (β) in g/l pro Zeiteinheit (h) zwischen zwei Messpunkten an. Diese kann mit der Gleichung (2.6) berechnet werden. Die größte Produktbildung pro h über die Gesamtprozesszeit, sprich der größte Wert bezüglich der maximalen Produktivität, wird in dieser Arbeit als P_{\max} spezifiziert.

$$P_{\max} = \frac{(\beta_{t_2} - \beta_{t_1})}{(t_2 - t_1)} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

2.8.5 Berechnung des Maximalumsatzes

Der maximale Zuckerverbrauch bzw. der Maximalumsatz (U_{\max}) in g/(l·h) ist die maximale verbrauchte Zuckerkonzentration (β) in g/l pro Zeiteinheit (h) zwischen zwei Messpunkten und wurde mit der Gleichung (2.7) bestimmt. Analog zur Bestimmung von P_{\max} , ist der Maximalwert hinsichtlich des Zuckerumsatzes über die Gesamtprozesszeit als U_{\max} im Ergebnisteil wiedergegeben.

$$U_{\max} = \frac{(\beta_{t_1} - \beta_{t_2})}{(t_2 - t_1)} \quad (\text{Gl. 2.7})$$

2.8.6 Berechnung der Selektivität

Die Selektivität (S in %) wurde bezüglich des gebildeten D-Lactats mit der Gleichung (2.8) berechnet. Diese ist der Quotient aus der maximalen Produktkonzentration (c_{\max}) in (mol/l) und dem Umsatz (Differenz der initialen Zuckerkonzentration und der residualen Zuckerkonzentration bei Kultivierungsende) in mol/l. Für die prozentuale Berechnung wurde das Ergebnis mit 100 multipliziert und durch den Quotienten ($Q_{S/P}$) der molaren Massen des eingesetzten Zuckers und des Produkts dividiert.

$$S = \left(\frac{c_{\max}}{c_{\text{Zucker}_{\text{initial}}} - c_{\text{Zucker}_{\text{residual}}}} \right) \cdot \frac{100}{Q_{S/P}} \quad (\text{Gl. 2.8})$$

Bei der Verwendung von Glucose als Zucker (180 g/mol) und unter der Berücksichtigung der molaren Masse von 90 g/mol für Milchsäure wird somit ein Quotient von 2 erhalten.

2.8.7 Berechnung der Ausbeute

Für die Bestimmung der Ausbeute ($Y_{P/S}$ in %) an D-Lactat wurde die Gleichung (2.9) verwendet. Dazu wurde der Quotient aus den Stoffmengenkonzentrationen (c in mol/l) des Produkts (c_{\max}) nach Kultivierungsende und des initialen Zuckers ($c_{\text{Zucker}_{\text{initial}}}$) gebildet. Das Ergebnis wurde folglich mit 100 multipliziert und mit der maximalen theoretischen Ausbeute dividiert.

$$Y_{P/S} = \left(\frac{c_{\max}}{c_{\text{Zucker}_{\text{initial}}}} \right) \cdot \frac{100}{Y_{\text{theoretisch}}} \quad (\text{Gl. 2.9})$$

Wird Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet, so ist der Wert für die maximale theoretische Ausbeute gleich 2. Somit können theoretisch 1 Mol Glucose zu 2 Mol D-Lactat umgesetzt werden.

2.8.8 Quantitative Phosphatbestimmung mittels Vanadat-Molybdat-Methode

Das Prinzip dieser Methode basiert auf dem Sachverhalt, dass Vanadate und Molybdate in saurer Lösung unter Wasserabspaltung zu Polyvanadeten und Polymolybdaten kondensieren. Bei der Inkorporation eines Phosphations entstehen gelbgefärbte Heteropolyverbindungen. Die Anzahl dieser Verbindungen ist direkt proportional zur Konzentration der inkorporierten Phosphationen und kann durch die photometrische Messung der Extinktion bestimmt werden [80]. Die Extinktion folgt dabei dem Lambert-Beerschen Gesetz, welches mit der Gleichung (2.10) beschrieben werden kann. Die Extinktion (E_{λ}) kann durch den dekadischen Logarithmus des Verhältnisses des einfallenden Lichts (I_0) und des transmittierten Lichts (I_T) erhalten werden.

$$E_{\lambda} = \log_{10} \cdot \left(\frac{I_0}{I_T} \right) = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d_k \quad (\text{Gl. 2.10})$$

Es wird somit ein dimensionsloser Wert für Verminderung der Lichtintensität gemessen. Diese

Verminderung ist direkt proportional zum molaren, dekadischen Extinktionskoeffizienten des gelösten Stoffes bei einer bestimmten Wellenlänge (ϵ_λ), der Stoffmengenkonzentration des Stoffes (c) in der Lösung und der Schichtdicke der Messküvette (d_k).

Zur Untersuchung des Phosphatgehalts während der Kultivierung, wurde ein Standardexperiment mit dem *Sporolactobacillus inulinus* (4,0 % Inokulum einer VK mit einer $OD_{605} = 0,4$, Medienzusammensetzung siehe Tabelle 2.4) im Bioreaktor mit 60,0 g/l $CaCO_3$ als Neutralisationsmittel über eine Gesamtdauer von 160 h durchgeführt. Die zu untersuchenden Proben wurden bei 20800 g (für 15 min) zentrifugiert und der Überstand wurde für die weitere Prozessierung 100-fach verdünnt (1:99). Zur Untersuchung des Phosphatgehalts wurde die verwendete Vanadat-Molybdat-Reagenz (Hach Lange GmbH) nach Herstellerangaben jeweils mit 5 ml des verdünnten Überstands der entsprechenden Probenahmepunkte befüllt. Die Proben wurden durch vorsichtiges Schwenken homogenisiert und nach 10 min Inkubationsdauer photometrisch (Spektralphotometers DR 2800, Hach-Lange) bei 435 nm vermessen. Die Ergebniswerte wurden gerätespezifisch aus dem Mittelwert von 35 Messungen gebildet.

Die Genauigkeit der Messergebnisse wurde anschließend mit Hilfe eines Plausibilitätsnachweises (Standardaddition) geprüft. Dazu wurden 250 μ l eines Phosphatstandards (596,0 mg/l) zu der Probe hinzugegeben und nach vorsichtiger Homogenisierung und 10-minütiger Inkubation nochmals gemessen. Im Folgenden wurde der theoretisch berechnete Phosphatwert durch die Zugabe des Standards (mg/l) mit den tatsächlich gemessenen Werten verglichen und eine Wiederfindungsrate (in %) bestimmt.

2.8.9 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, High-Performance-Liquid-Chromatography)

Unter Zuhilfenahme der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie können schwer verdampfbare Analyten mittels einer mobilen Phase (Eluent) über eine stationäre Phase (Trennsäule) chromatographisch aufgetrennt werden, wobei die Verweildauer (Retentionszeit) des Analyten an der stationären Phase von seinen chemischen Eigenschaften abhängt. Je stärker die Wechselwirkung des Analyten mit dem Säulenmaterial, desto länger verweilt er auf der Säule. Die Analyten können somit anhand ihrer spezifischen Verweildauer auf der Säule durch entsprechende Detektoren nachgewiesen werden. Gegen eine Kalibriergerade können die Substanzen qualitativ als auch quantitativ bestimmt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine HPX-87H-Trennsäule (Biorad) als stationäre Phase und 5,0 mM H_2SO_4 (Eluent) als mobile Phase verwendet. Die Trennungsprinzipien beruhen hier auf Größenausschluss-, Ionenausschluss- und Ionenaustauschchromatographie. Die Detektion der Kohlenstoffquellen und Stoffwechselprodukte der Bakterien (organische Säuren) wurden mit Hilfe eines

refraktometrischen Detektors (RI), gegen eine Referenzzelle realisiert. Die organischen Säuren wurden zusätzlich mittels eines UV-Detektors bei 210 nm erfasst. Die Analyse bzw. Quantifizierung der Peakflächenintegrale erfolgte für die entsprechenden Substanzen anhand einer Kalibriergeraden (4-Punkt-Kalibration). In der Tabelle 2.9 sind die Parameter und Spezifikationen der hier verwendeten HPLC-Methoden aufgeführt.

Tabelle 2.9: Gerätekomponenten, Spezifikationen und Parameter hinsichtlich der verwendeten HPLC-Methoden.

Gerätekomponente	Spezifikationen und Parameter	Hersteller
Vorsäule	Micro-Guard Cation H+ Cartridge, (30 x 4,6 mm)	Biorad
Säule	HPX-87H (300 x 7,8 mm, 9 µm Partikelgröße)	Biorad
Säulenmaterial	sulfoniertes Styrol-Divinylbenzol-Copolymer	
Form	Ionisch	
Eluent	H ₂ SO ₄ (5,0 mM)	
RI-Detektor	RID-6A	Shimadzu
UV-Detektor	SPD 10A bei 210 nm	Shimadzu
Säulentemperatur	60 °C 20 °C	
Flussrate	0,7 ml/min 0,4 ml/min	
Laufzeit	30 min 50 min	
Probenvolumen	20 µl Injektionsschleife	
Software	Labsolution	Shimadzu

Bei Experimenten mit Di- oder Trisaccharide als Kohlenstoffquelle wurden die HPLC-Messungen generell bei 20 °C (siehe Tabelle 2.9) prozessiert, um zum einen die Hydrolyse der Zucker zu vermeiden und um zum anderen die Trenneffizienz der verschiedenen Zucker bzw. die Auflösung der Peaks zu erhöhen (z.B. bei einem Gemisch aus Saccharose, Glucose und Fructose). Proben von Ansätzen mit Glucose als Kohlenstoffquelle wurden hingegen bei einer Säulentemperatur von 60 °C vermessen.

Die zu vermessenen Proben wurden aus Zellfreien Überständen (Zentrifugation bei 20800 g) der Kultivierungsexperimente hergestellt. Die Proben aus Experimenten, unter der Applikation von NH₃-Lösung als Neutralisationsmittel wurden mit 50,0 mM H₂SO₄ 20-fach verdünnt (1:19) und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die geringe Verdünnung war hier notwendig um die Nebenprodukte der Bakterien entsprechend quantifizieren zu können.

Demgegenüber sind bei Ansätzen mit CaCO₃ als Neutralisationsmittel, hochviskose Proben mit abgeschnittenen Pipettenspitzen (oder optional mit einem Spatel, wenn sich die Probe nicht mehr pipettieren ließ) in Eppendorfgefäße (unter der Sterilwerkbank) mit bekannten Leergewicht überführt worden. Die Gefäße wurden anschließend rückgewogen und die Proben sind mit 5,0 % HCl-Lösung verdünnt (1:1) worden, um das präzipitierte Ca-Lactat wieder in Lösung zu bringen. Im Folgenden wurden die verdünnten Proben für 10 min bei 70 °C aufbewahrt. Um Ablagerungen der gelösten

Calciumverbindungen im Totvolumen der HPLC zu vermeiden, sind 500 µl der angesäuerten Lösung im einem weiteren Schritt mit einem Volumen H₂SO₄ (3,0 M) aufgenommen worden. Die ausgefällten Proben wurden anschließend für 20 min bei 20800 g zentrifugiert und der Überstand wurde entsprechend mit Eluent 40-fach, 50-fach und 100-fach verdünnt (1:39, 1:49, 1:99).

2.8.10 Enantiomerenbestimmung mittels chiraler Ligandenaustausch-HPLC

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass die stationäre Phase (D-Penicillamin) die Kupfer-(II)-ionen der mobilen Phase reversibel binden kann. Dadurch ist eine Komplexbildung mit den Analyten bzw. mit den Lactatmolekülen möglich, die durch die π -Elektronen der Carbonylgruppe und durch die Elektronen des Sauerstoffatoms ihrerseits an die Metallionen koordinieren können. Interagiert jedoch das andere Enantiomer des Lactats aus der mobilen Phase mit dem zuvor gebildeten Komplex, so kommt es zur Enantiomerentrennung. Dabei koordinieren die beiden Lactatenantiomere sowie der Penicillamin-Ligand an das Kupfer-(II)-Ion. Der Grund für die Trennung ist dabei zum einen die unterschiedliche thermodynamische Stabilität der chiralen Komplexe, zum anderen die Tatsache, dass die ionischen Bindungen zwischen der Säule und den einzelnen Komponenten äußerst schwach sind. (81). Somit kommt es zu einem schnellen Ligandenaustausch und zu einer chromatographischen Separation der D- und L-Enantiomere.

Für die Analyse der optischen Reinheit des D-Lactats wurden die zu untersuchenden Proben in 2,0 mM CuSO₄·5H₂O 50-fach verdünnt (1:49) und folglich mit der HPLC gemessen. Für die Verifizierung wurden die Ergebnisse gegen Messungen von D- und L-Lactatstandards (500,0 mg/l) referenziert. Die relevanten Methodenparameter sind in der Tabelle 2.10 zusammengefasst.

Tabelle 2.10: Gerätekomponenten, Spezifikationen und Parameter hinsichtlich der chiralen HPLC-Messungen.

Gerätekomponenten	Spezifikationen und Parameter	Hersteller
Säulenmaterial	N,S-dioctyl-(D)-Penicillamin	
Dieluent	2,0 mM CuSO ₄ ·5H ₂ O/ Isoprop. (95:5)	
UV-Detektor	SPD 10A bei 250 nm	Shimadzu
Säulentemperatur	RT	
Flussrate	1 ml/min	
Druck	100 bar	
Laufzeit	30 min	

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Allgemeine Charakterisierung der *Sporolactobacillus* Spezies zur Eignung für die biotechnische Herstellung von D-Lactat

Die Charakterisierung der beiden *Sporolactobacillus* Spezies sollte aufzeigen, ob die Stämme potentiell für eine biotechnische Anwendung zur D-Lactatproduktion geeignet sind. Diesbezüglich sollte zum einen die Effizienz der Konversion von eingesetzter Glucose zu D-Lactat ermittelt werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die D-Lactatproduktion im kausalen Zusammenhang mit dem Populationswachstum der Bakterien steht. Ferner ist die optische Reinheit des D-Lactats bezüglich beider Stämme mittels chiraler HPLC bestimmt worden. Zur Untersuchung der Konversionseffizienz von Glucose zu D-Lactat sind für beide Stämme Experimente im modifizierten Glucose-Yeast-Peptide-Medium (GYP-Medium, siehe Tabelle 2.4, Seite 22), mit 60,0 g/l Calciumcarbonat (CaCO_3) und 100,0 g/l Glucose, ohne Rührung angesetzt worden. Für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der D-Lactatproduktion und der Zunahme der bakteriellen Populationsdichte ist neben der Lactat-Konzentration (bei 160,0 g/l Glucose), zusätzlich die optische Dichte bei 605 nm (OD_{605}) zu den jeweiligen Probenahmepunkten gemessen worden. Die Ergebnisse der Experimente werden in den Abbildung 3.1 und Abbildung 3.3 präsentiert.

3.1.1 Allgemeine Charakterisierung des *Sporolactobacillus inulinus*

Aus der Abbildung 3.1 (links) ist zu erkennen, dass der *Sporolactobacillus inulinus* die eingesetzten 100,0 g/l Glucose innerhalb von 13 d nahezu vollständig zu D-Lactat konvertiert.

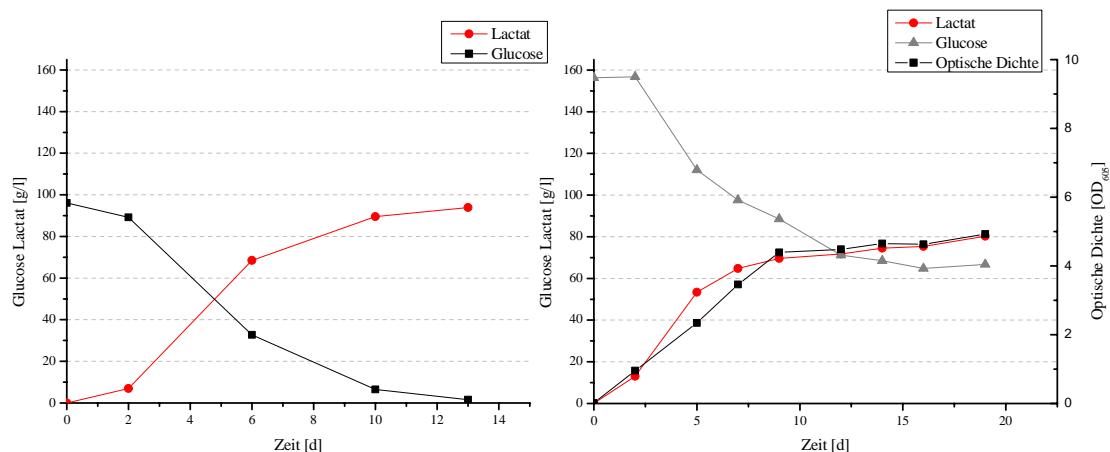


Abbildung 3.1: Links sind die Untersuchung zur D-Lactatproduktion für den *Sporolactobacillus inulinus* anhand der Glucose- und Lactat-Konzentration [g/l] im GYP-Medium (100,0 g/l Glucose) dargestellt. Demgegenüber illustriert das rechte Diagramm die Messwerte der Lactat-Konzentration [g/l] und der optischen Dichte [OD_{605}] im GYP-Medium bei einer Glucosekonzentration von 160,0 g/l. Beide Experimente wurden in 100 ml Arbeitsvolumen bei 0 RPM, 38 °C und 4,0 % Inokulum (Vorkultur $\text{OD}_{605} = 0,4$) durchgeführt. Neutralisationsmittel: 60,0 g/l CaCO_3 .

Dabei konnte eine Ausbeute von 97,7 % ermittelt werden. Des Weiteren zeigt der rechte Teil der Abbildung 3.1, dass mit der Zunahme der Produktkonzentration ebenfalls die Werte der optischen Dichte für die Messpunkte zunehmen, wobei die Steigung beider Kurven ab 7 d Kultivierungsdauer signifikant abflacht. Auf Grund dieser Resultate kann geschlussfolgert werden, dass die Produktkonversion für den *Sporolactobacillus inulinus* wachstumsgekoppelt ist.

Zudem ist in der Abbildung 3.2 eine Korrelation hinsichtlich der optischen Dichte (OD_{605}) und der Biotrockenmasse (BTM) in g/l hergestellt worden. Anhand der Regression kann die Biotrockenmasse [g/l] als Produkt der OD_{605} und des Faktors 0,4769 berechnet werden.

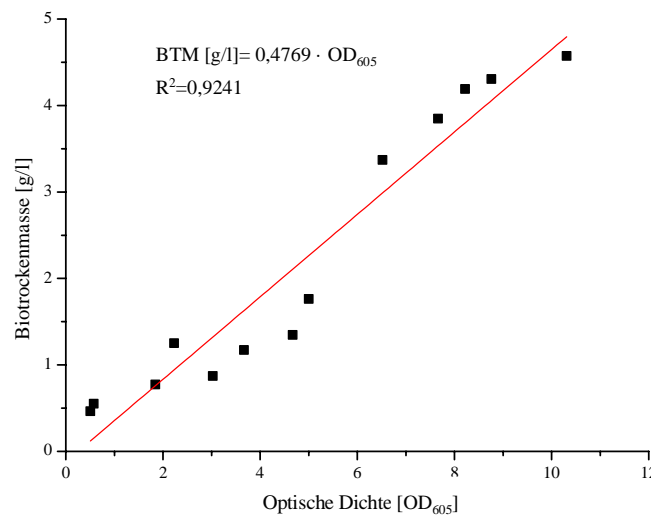


Abbildung 3.2: Korrelation zwischen Biotrockenmasse [g/l] und der optischen Dichte der Zellkulturen bei 605 nm (OD_{605}) für den *Sporolactobacillus inulinus*.

Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression weist dabei einen Wert von 0,9241 auf. Die Variation von ca. 7,0 % kann damit erklärt werden, dass zur Bestimmung des BTM, das restliche $CaCO_3$ bzw. das präzipitierte Calciumlactat hydrolysiert werden musste um die Biomasse durch Zentrifugation von dem Medium abtrennen zu können. Die Hydrolyse der Feststoffe kann unter anderen ebenfalls zu einer Zelllyse geführt haben, welche den Fehler erklären würde.

3.1.2 Allgemeine Charakterisierung des *Sporolactobacillus putidus*

Der linke Teil der Abbildung 3.3 zeigt die fast vollständige Konversion der Glucose zu D-Lactat innerhalb von 13 d Kultivierungsdauer. Die Ausbeute beträgt dabei 98,4 %. Weiterhin ist im rechten Teil der Abbildung 3.3 zu sehen, dass die Werte der Lactat-Konzentration und der OD_{605} bis zum Tag 9 der Kultivierung simultan ansteigen, während die OD-Kurve darüber hinaus bei einer OD_{605} von 4,0 stagniert. Die Stagnation der OD-Kurve kann mit der Tatsache erklärt werden, dass der *Sporolactobacillus putidus* mit steigender Biomasse zur Zell-Aggregation neigt.

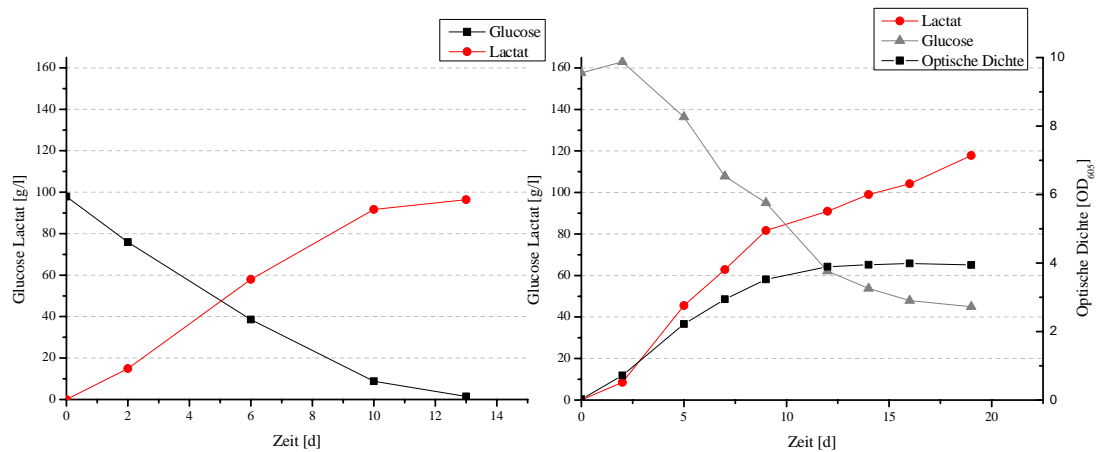


Abbildung 3.3: Links sind die Untersuchung zur D-Lactatproduktion für den *Sporolactobacillus putidus* anhand der Glucose- und Lactat-Konzentration [g/l] im GYP-Medium (100,0 g/l Glucose) dargestellt. Demgegenüber illustriert das **rechte** Diagramm die Messwerte der Lactat-Konzentration [g/l] und der optischen Dichte [OD₆₀₅] im GYP-Medium bei einer Glucosekonzentration von 160,0 g/l. Beide Experimente wurden in 100 ml Arbeitsvolumen bei 0 RPM, 38 °C und 4,0 % Inokulum (Vorkultur OD₆₀₅ = 0,4) durchgeführt. Neutralisationsmittel: 60,0 g/l CaCO₃.

Da dieser Versuch ohne Rührung durchgeführt worden ist, konnten sich Aggregate aus Biomasse und CaCO₃ bilden, wodurch die tatsächliche Biomasse höher gewesen sein kann als durch die OD-Messung bestimmt werden konnte. In diesem Kontext ist auch keine Korrelation der OD mit der BTM möglich gewesen. Eine Visualisierung der Zell-Aggregation findet sich als Beispiel eines Reaktorexperiments (mit NH₃·H₂O als Neutralisationsmittel) in der Abbildung 3.4.



Abbildung 3.4: Zellaggregation des *Sporolactobacillus putidus* im Bioreaktor mit NH₃·H₂O als Neutralisationsmittel.

Wobei hier auch folgerichtig angenommen werden kann, dass die Produktbildung und die Zunahme der Biomasse zumindest teilweise (Übergang in zur exponentiellen Phase) proportional zueinander sind. Als Konsequenz der ungeeigneten OD-Bestimmung für die Zunahme der Biomasse, wurde für weiterführende Experimente, die Produktbildung ebenfalls als Marker für das Wachstum der Zellpopulation gesetzt. Folglich sind die Begriffe Wachstum und D-Lactatproduktion im weiteren Verlauf

der Arbeit gleichwertig betrachtet worden.

3.1.3 Produktspektrum organischer Säuren hinsichtlich der *Sporolactobacillus* Spezies

In der Abbildung 3.5 ist ein zudem repräsentatives HPLC-Chromatogramm bzgl. beider Spezies (entspricht der Abbildung 3.1 und Abbildung 3.3 (links) nach 10 d Kultivierungsdauer) dargestellt. Aus dem HPLC-Chromatogramm ist zu entnehmen, dass die Bakterien stoffwechselspezifisch ein sehr geringes Nebenproduktspektrum aufweisen. Die neben der Milchsäure (C) weiteren abundanten Peaks im Chromatogramm sind zu einen, Ameisensäure (D), Essigsäure (E) und Propionsäure (F). Im Verhältnis zu der Konzentration der Milchsäure sind die Nebenprodukte generell unterrepräsentiert. Zudem tritt der Peak der Ameisensäure nur intermediär auf und kann nicht bei jedem Probenahmezeitpunkt verifiziert werden. Demzufolge ist es möglich, dass die Ameisensäure von den Bakterien entweder weiter metabolisiert wird und/ oder sie wird aufgrund der geringen Molekülmasse (46,0 g/mol) zusammen mit dem CO₂ (44,0 g/mol) ausgetrieben.

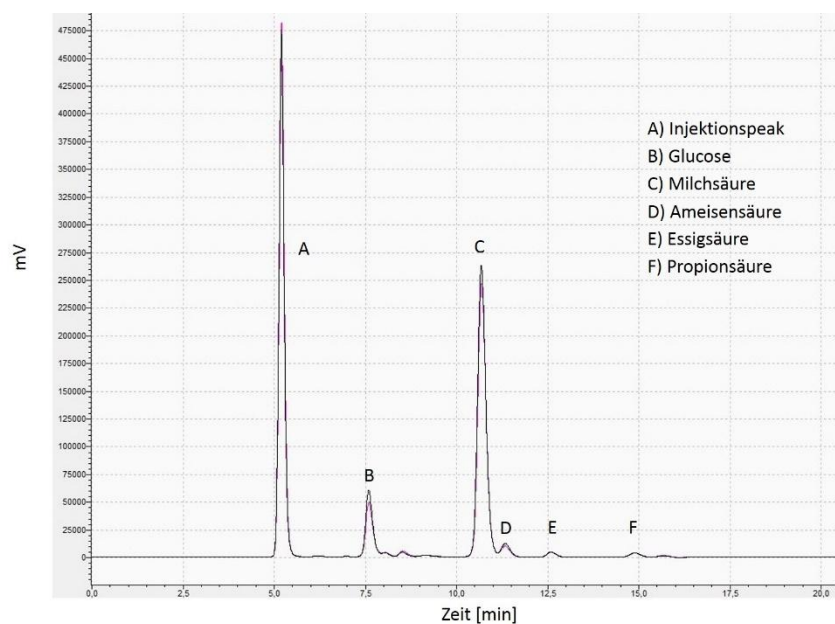


Abbildung 3.5: HPLC-Chromatogramm nach 10 h Kultivierungsdauer für beide *Sporolactobacillus* Spezies. Säule: HPX-87H. Säulenmaterial: sulfoniertes Styrol-Divinylbenzol-Copolymer. Eluent: 5,0 mM H₂SO₄. Säulentemperatur: 60 °C. Druck: ~60 bar. Flussrate: 0,7 ml/ min. Injektionsvolumen: 20 µl. RI-Detektor.

3.1.4 Bestimmung der optischen Reinheit von D-Lactat

Des Weiteren ist die optische Reinheit des Lactats nach Beendigung der Kultivierung mittels HPLC und einer chiralen Trennsäule bestimmt worden. Die Ergebnisse der Analysen sind in der Abbildung 3.6 dargestellt.

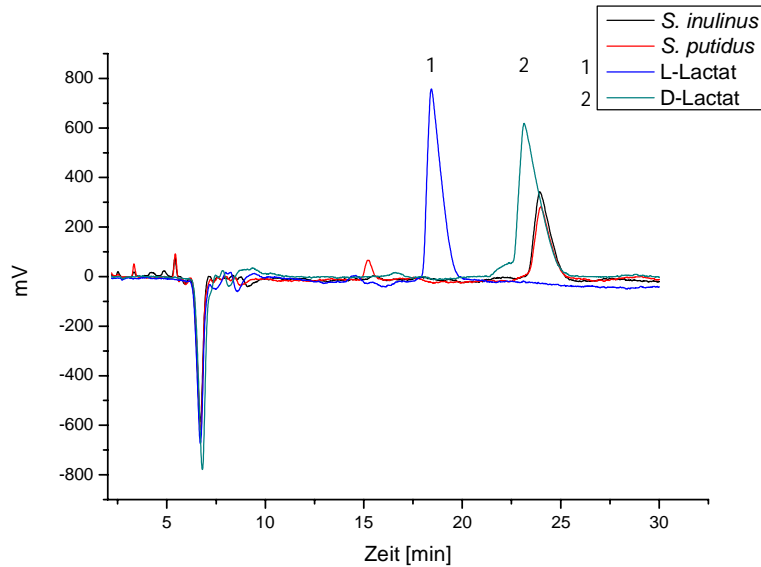


Abbildung 3.6: Ligandenaustausch-Chromatogramm zur Bestimmung der optischen Reinheit der Lactat-Enantiomere hinsichtlich der Kultivierungen der *Sporolactobacillus* Spezies. **1. L-Lactat-Standard. 2. D-Lactat-Standard.** Säulenmaterial: N,S-dioctyl-(D)-Penicillamin. Dieluent: 2,0 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ / Isoprop. (95:5). Säulentemperatur: RT. Flussrate: 1 ml/ min. Druck: 100 bar. UV-Detektor bei 250 nm.

Aus der Abbildung ist zu entnehmen, dass beide *Sporolactobacillus* Spezies ausschließlich D-Lactat bilden, zumal kein quantifizierbares Signal für das L-Lactat in den Kultivierungsproben gemessen werden konnte. Für die optische Reinheit des D-Lactats der hier verwendeten Biokatalysatoren kann ein Wert von >99,0 % angenommen werden.

Schlussfolgerung: Anhand der präsentierten Experimente, kann die Eignung der beiden Spezies für die biotechnische Herstellung von D-Lactat nachgewiesen werden. Sowohl der Konzentrationsbereich in dem die Bakterien wirken können, als auch die optische Reinheit des Produkts machen dies deutlich. Dennoch muss in weiterführenden Experimenten die Prozesszeit weiter minimiert werden. Die lange Kultivierungsdauer von 19 d bzw. die geringe Gesamtproduktivität von 0,18 (*S. inulinus*) bzw. 0,26 g/(l·h) (*S. putidus*), besonders bei höheren Glucosestartkonzentrationen (160,0 g/l, siehe Abbildung 3.1 (rechts), Seite 43 und Abbildung 3.3 (rechts), Seite 45), führt zu einer zunehmenden Braunfärbung des Mediums über die Prozessdauer.

Diese Färbung kann mit der Maillard-Reaktion erklärt werden, wobei unter anderem Zucker und Aminosäuren miteinander zu komplexeren Verbindungen reagieren [82]. Diese komplexeren Produkte können wiederum das Wachstum von Bakterien negativ beeinflussen (Helou *et al* 2014) und führen letztendlich zu einer verminderten Gesamtproduktivität [83]. Daher soll in den folgenden Experimenten die Gesamtproduktivität durch die Bestimmung der Optimaltemperatur der Bakterien und durch die Optimierung der Kultivierungsbedingungen im Erlenmeyerkolben gesteigert werden.

3.2 Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf das Wachstum der *Sporolactobacillus* Spezies

Ziel dieser Experimente war es, das temperaturabhängige Wachstum der *Sporolactobacillus* Spezies mittels Mikrotiterplatten-Kultivierung zu untersuchen, um eine Optimaltemperatur für weitere Experimente zu bestimmen und die Effizienz des Gesamtprozesses zu steigern.

3.2.1 Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf das Wachstum des *Sporolactobacillus inulinus*

Zur Bestimmung des bakteriellen Wachstums wurde der *Sporolactobacillus inulinus* im 96-Well-Maßstab bei verschiedenen Temperaturen in einem temperierbaren Mikrotiterplattenleser für 24 Stunden inkubiert. Um die Effekte der verschiedenen Inkubationstemperaturen auf das bakterielle Wachstum darstellen zu können, wurden die optische Dichten bei 605 nm (OD_{605}) als Wachstumsparameter in der exponentiellen Phase nach 15 h miteinander verglichen. Des Weiteren wurde ein Temperaturbereich von 31 – 45 °C in zweier Inkrementen untersucht (Abbildung 3.7).

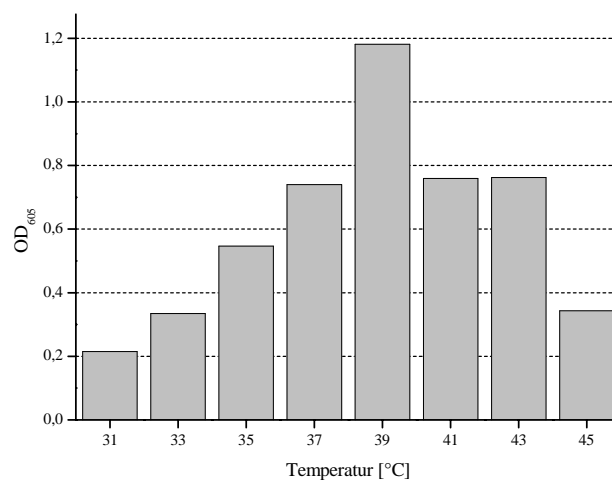


Abbildung 3.7: Einfluss verschiedener Temperaturen anhand der OD_{605} nach 15 h für den *Sporolactobacillus inulinus* im 96-Well-Mikrotiterplatten-Maßstab in einem Arbeitsvolumen von 150 µl. Kultivierung im GYP-Medium mit 20,0 g/l Glucose (ungepuffert) bei einem Inokulum von 4,0 % (einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 0,4). Durchmischung vor jedem Messpunkt bei 500 RPM für 5 s.

Die Abbildung 3.7 macht deutlich, dass die optische Dichte der Bakterien mit steigender Inkubationstemperatur zunimmt. So steigt die OD_{605} bei 31 °C mit einem Wert von 0,2, sukzessive auf einen Maximalwert von 1,2 bei 39 °C. Darüber hinaus nehmen die Werte der optischen Dichte mit höherer Temperatur wieder ab und erreichen einen Wert von 0,34 bei einer Temperatur von 45 °C. Bei der Charakterisierung des Stammes durch Kitahara und Suzuki (1963) konnten sich die Autoren anhand der Experimentaldaten auf keinen distinkten Wert für die optimale Temperatur festlegen. Sie

vermuteten, dass die optimale Wachstumstemperatur (35 °C) der Bakterien und die optimale Stoffwechseltemperatur (38 °C) für die D-Lactatproduktion unterschiedlich sind [84]. Anhand der Ergebnisse aus (siehe Kapitel 3.1.1, Seite 43 folgende) und der hier gezeigten Daten, kann aber davon ausgegangen werden, dass die D-Lactat-Biosynthese und das bakterielle Wachstum miteinander gekoppelt sind. Somit ist die optimale Wachstumstemperatur bei 39 °C mit der optimalen Temperatur für die D-Lactatproduktion gleichzusetzen.

3.2.2 Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf das Wachstum des

Sporolactobacillus putidus

Die Experimente zur Untersuchung des temperaturabhängigen Wachstums bezüglich des *Sporolactobacillus putidus* wurden analog zu den Experimenten des *Sporolactobacillus inulinus* durchgeführt. Auch hier wurde ein Temperaturbereich von 31 – 45 °C untersucht und die Werte der optischen Dichte (OD₆₀₅) wurden nach 15 h in der exponentiellen Wachstumsphase verglichen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der Abbildung 3.8 skizziert.

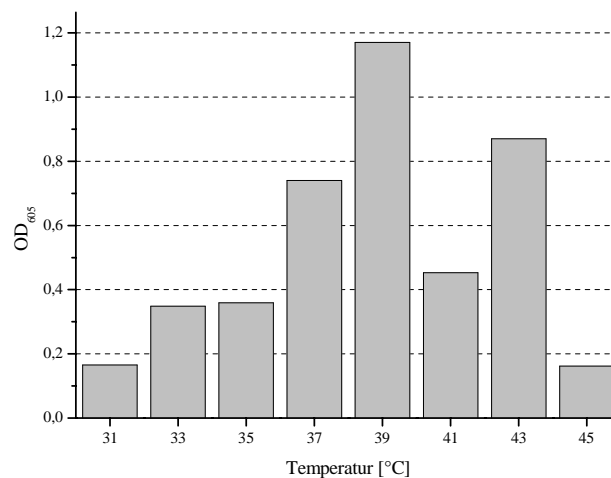


Abbildung 3.8: Einfluss verschiedener Temperaturen anhand der OD₆₀₅ nach 15 h für den *Sporolactobacillus putidus* im 96-Well-Mikrotiterplatten-Maßstab in einem Arbeitsvolumen von 150 µl. Kultivierung im GYP-Medium mit 20,0 g/l Glucose (ungepuffert) bei einem Inokulum von 4,0 % (einer Vorkultur bei einer OD₆₀₅ von 0,4). Durchmischung vor jedem Messpunkt bei 500 RPM für 5 s.

Die Abbildung zeigt, dass das Wachstum der Bakterien mit steigender Temperatur zunimmt. Diesbezüglich wird ein Maximum bei 39 °C mit einem OD₆₀₅-Wert von 1,17 erreicht. Bei weiterer sukzessiver Steigerung der Inkubationstemperatur nehmen die OD₆₀₅-Werte wieder ab. Der nicht erwartungsgemäße OD₆₀₅-Wert von 0,45 bei 41 °C kann damit erklärt werden, dass die Bakterien bei diesem Experiment über alle Ansätze eine verlängerte Lag-Phase (im Vergleich zu den Experimenten bei 39 bzw. 43 °C) aufwiesen und somit die OD₆₀₅ nach 15 h deutlich geringer ausfällt (siehe Abbildung

5.2 im Anhang, Seite 117). Fujita *et al.* (2010), der diesen Stamm isoliert und charakterisiert hat, gibt eine Optimaltemperatur von 35 °C für das Wachstum des *Sporolactobacillus putidus* an [85]. Die Werte der gezeigten Ergebnisse weichen doch deutlich von den Literaturdaten ab, sodass die hier erzielten Erkenntnisse als Grundlage für weitere Experimente dienen sollten.

Schlussfolgerung: Für folgende Kultivierungsexperimente wurde eine Temperatur von 38 °C für beide Spezies gewählt, da das Optimum in einem sehr engen Temperaturbereich liegt (± 2 °C) und in einem großtechnischen Prozess die Temperatur möglicherweise nicht so präzise gesteuert werden kann.

3.3 Allgemeine Kultivierungsbedingungen für die *Sporolactobacillus* Spezies

Die Zielsetzung dieser Studie ist es, die Kultivierungsbedingungen im Erlenmeyerkolben hinsichtlich unterschiedlicher Calciumcarbonate (Neutralisationsmittel) zu untersuchen um ein reproduzierbares Testverfahren für weitere Experimente zu etablieren. Diesbezüglich standen zwei Calciumcarbonate zur Verfügung, die sich aufgrund ihres Herstellungsprozesses (gefällt oder gepulvert) in der Partikelgröße (siehe Abbildung 3.9, (A) CaCO_3 gefällt und (B) CaCO_3 gepulvert) unterschieden und somit auch verschiedene Dispersionseigenschaften im Medium aufwiesen.

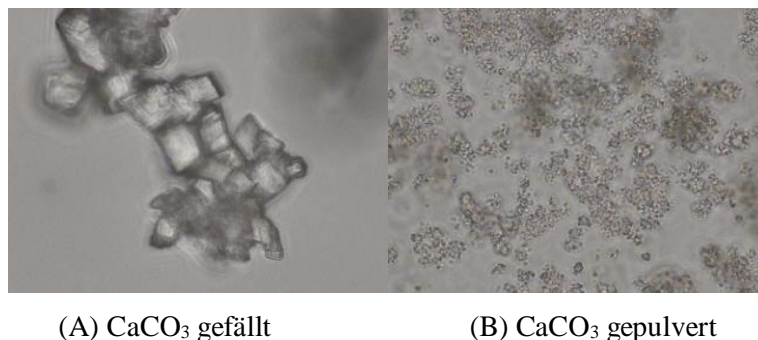


Abbildung 3.9: Mikroskopische Untersuchungen von (A) gefällttem CaCO_3 und (B) gepulvertem CaCO_3 im Phasenkontrast (20-fach Objektiv).

Zur Untersuchung der Einflüsse der Dispersionseigenschaften der Calciumcarbonate auf die D-Lactatproduktion der *Sporolactobacillus* Spezies sind jeweils vier verschiedene Versuche (V1-V4) gemacht worden. Dazu wurden Ansätze mit jeweils 60,0 g/l beider Carbonate entweder stehend (0 RPM) oder mit 120 RPM Rührgeschwindigkeit bei 38°C inkubiert. Zudem ist je Experiment eine Glucosestartkonzentration von 140,0 g/l vorgegeben worden.

- V1 zeigt das Experiment mit dem gefälltten CaCO_3 (siehe Abb. 3.9 A) bei 120 RPM.
- V2 ist mit dem gefälltten CaCO_3 bei 0 RPM initiiert worden.

- V3 repräsentiert ein Experiment mit dem gepulverten CaCO_3 (siehe Abb. 3.9 B) bei 120 RPM Rührgeschwindigkeit.
- V4 ist mit dem gepulverten CaCO_3 bei 0 RPM angesetzt worden.

Zusätzlich zur zeitlich abhängigen D-Lactatproduktion, ist auch der pH-Verlauf untersucht worden, um Rückschlüsse auf die nötigen pH-Bedingungen ziehen zu können.

3.3.1 Allgemeine Kultivierungsbedingungen für den *Sporolactobacillus inulinus*

Die Resultate der Untersuchung sind für den *Sporolactobacillus inulinus* anhand der Lactat-Konzentration [g/l] und des pH-Verlaufs gegen die Zeit [h] in der Abbildung 3.10 dargestellt.

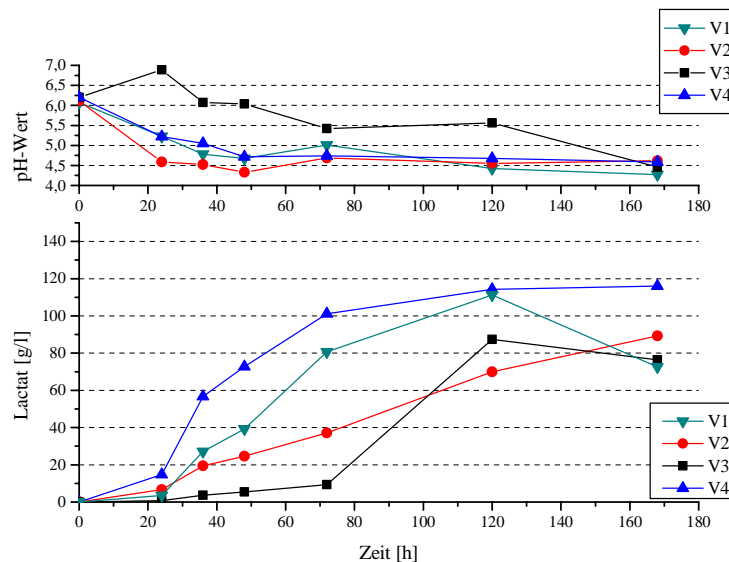


Abbildung 3.10: Einfluss von Calciumcarbonaten (gefällt/ gepulvert) für den *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 140,0 g/l Glucose bei 38 °C. 4 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 0,4. V1: CaCO_3 gefällt bei 120 RPM. V2: CaCO_3 gefällt bei 0 RPM. V3: CaCO_3 gepulvert bei 120 RPM. V4: CaCO_3 gepulvert bei 0 RPM.

Aus der Abbildung wird deutlich, dass mit dem Einsatz des gepulverten CaCO_3 bei 0 RPM (V4), die höchsten Produktkonzentrationswerte zu den jeweiligen Probenahmepunkten gemessen werden konnten. Des Weiteren erreicht das Experiment mit den gefällten CaCO_3 bei 120 RPM (V1) die nächst höheren Werte über den zeitlichen Verlauf, wobei nach 168 h wieder eine verringerte D-Lactatkonzentration gemessen werden konnte. Der Ansatz mit dem gepulverten CaCO_3 bei 120 RPM (V3) zeigt einen sehr langen Übergang der Bakterien zur exponentiellen Phase und deutlich geringere Produktkonzentrationen zu den Ansätzen V4 und V1. Ungeachtet dessen zeigt der Ansatz mit gefällten CaCO_3 bei 0 RPM (V2) zwar eine schnellere Zunahme der D-Lactatkonzentration als der Ansatz V3 auf, wenngleich auch diese unter den gemessenen Werten von V1 und V4 bleiben.

Stellt man diese Ergebnisse in kausalen Zusammenhang mit den jeweiligen pH-Verläufen, so kann man daraus interpretieren, dass bei dem Experiment mit dem gepulverten CaCO_3 bei 120 RPM (V3), der pH-Wert im Kultivierungszeitraum generell zu hoch war, was zu einer verlängerten Lag-Phase geführt hat. Im Gegensatz dazu wären dann die pH-Werte bei dem Ansatz mit gefällten CaCO_3 bei 0 RPM (V2) zu niedrig gewesen, wodurch die Wachstumsbedingungen für die Bakterien suboptimal gewesen sind. Lediglich die Experimente V1 und V4 zeigen einen konvergierenden pH-Verlauf auf. Die höheren Produktkonzentrationen hinsichtlich des Experiments V4 (im Vergleich zu V1) könnten möglicherweise durch eine Gradientenbildung im Medium und mit der Motilität der Bakterien erklärt werden.

So entsteht möglicherweise ein pH-Gradient durch den unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten der ungleichgroßen Carbonatpartikel (Siehe Abb. 3.9 B) in der Suspension. Die Bakterien hingegen vermeiden suboptimale pH-Bedingungen, indem sie sich mittels Flagellum (Kitahara und Suzuki, 1963) in optimalere Bereiche begeben können [84]. In diesem Fall würde der gemessene pH-Verlauf für den Ansatz V4 von dem tatsächlichen pH-Bereich, in dem sich die Bakterien aufhalten, abweichen.

Umgekehrt können anhand der Partikelgröße des gefällten CaCO_3 die Unterschiede der Experimente V1 und V2 begründet werden. Der höhere Sedimentationskoeffizient der gefällten Carbonatpartikel bewirkt, dass die Partikel ungleich des gepulverten CaCO_3 , schneller sedimentieren und infolgedessen Rührung benötigt wird, um die Partikel in Suspension zu halten. Letztendlich ist dadurch der Pufferungseffekt verbessert und die Bakterien erreichen höhere Produktkonzentrationen (V1).

3.3.2 Allgemeine Kultivierungsbedingungen für den *Sporolactobacillus putidus*

Die Abbildung 3.11 skizziert die Ergebnisse dieser Experimente für den *Sporolactobacillus putidus* mit Hilfe der D-Lactatkonzentration [g/l] und des pH-Verlaufs gegen die Zeit [h]. Der Abbildung kann entnommen werden, dass die Ansätze mit den gefällten CaCO_3 bei 120 RPM (V1) und gepulverten CaCO_3 bei 0 RPM (V4) die höchsten D-Lactatkonzentrationen nach 72 h aufweisen. Demgegenüber erreichen die Ansätze mit gefällten CaCO_3 bei 0 RPM (V2) und dem gepulverten CaCO_3 bei 120 RPM (V3) geringere Konzentrationen.

Analog zum *Sporolactobacillus inulinus* kann auch hier der pH-Verlauf möglicherweise diese Ergebnisse erklären. Während die Versuche V1 und V4 innerhalb eines pH-Bereichs von 5,5 bis 6,1 befinden, so verläuft die pH-Kurve bei V3 bei deutlichen höheren Werten ($>\text{pH } 6,0$). Hingegen verläuft die Kurve für V2 deutlich unter pH 5,0, was ebenfalls negative Auswirkung auf die Produktivität zu haben scheint. Laut Literatur besitzt der *Sporolactobacillus putidus* ein pH-Optimum für das Wachstum bei pH 4,5 [85]. Diese Angabe lässt sich mit den hier gezeigten Ergebnissen nicht bestätigen.

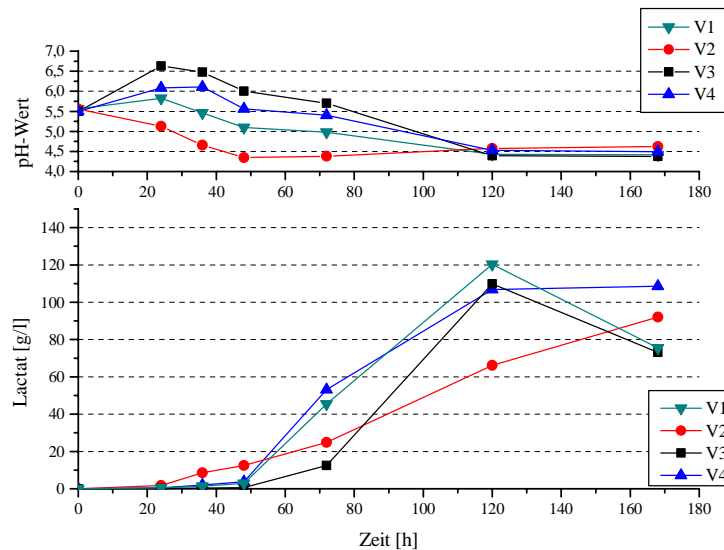


Abbildung 3.11: Einfluss von Calciumcarbonaten (gefällt/ gepulvert) für den *Sporolactobacillus putidus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 140,0 g/l Glucose bei 38 °C. 4 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 0,4. V1: $CaCO_3$ gefällt bei 120 RPM. V2: $CaCO_3$ gefällt bei 0 RPM. V3: $CaCO_3$ gepulvert bei 120 RPM. V4: $CaCO_3$ gepulvert bei 0 RPM.

Schlussfolgerung: Die Homogenisierung der Suspensionen bei 120 RPM scheint die Präzipitation von Calciumlactat zu fördern, da die Produktkonzentrationen der geschüttelten Ansätze (V1 und V3) bei den letzten Probenahmezeitpunkten (168 h) geringere Werte aufweisen als im Vergleich zu den gemessenen Konzentrationen bei 120 h. Dieser Sachverhalt kann mit dem Löslichkeitsprodukt von Calciumlactat erklärt werden, wobei die Löslichkeit bei ca. 100,0 g/l liegt [86]. Daher sind die Proben für die HPLC-Analyse bei den folgenden Experimenten entsprechend mit HCl hydrolysiert/ angesäuert worden, um das Präzipitat wieder in Lösung zu bringen (siehe Kapitel 2.8.9, Seite 41). Des Weiteren konnte mit Hilfe dieser Untersuchungen die Gesamtproduktivität für den *Sporolactobacillus inulinus* auf durchschnittlich (V1 und V4 nach 120 h) 0,95 und für den *Sporolactobacillus putidus* auf 1,01 g/(l·h) gesteigert werden. Im Gegensatz dazu erzielten die Experimente im Kapitel 3.1 (Abbildung 3.1 (rechts) und Abbildung 3.3 (rechts), Seite 43 und 45), bei ähnlicher Glucosestartkonzentration, deutlich geringere Produktivitätswerte mit 0,18 (*S. inulinus*) und 0,26 g/(l·h) für den *S. putidus*. Für die weitere Kultivierung der beiden Spezies wurde die Rührung bei 120 RPM mit dem gefällten Carbonat gewählt, da möglicherweise spätere Experimente aktiven Stofftransport erfordern. Zudem sollte so die Zellaggregation des *Sporolactobacillus putidus* (siehe Abbildung 3.4, Seite 45) vermindert werden.

3.4 Medienoptimierung zur Kultivierung der *Sporolactobacillus* Spezies

Die Experimente zur Medienoptimierung haben das Ziel die Signifikanz der einzelnen Komponenten des GYP-Mediums (DSMZ-Medium 852, siehe Anhang Tabelle 5.1, Seite 118) auf die Kultivierung der *Sporolactobacillus* Spezies zu ermitteln. So sind im Folgendem die im GYP-Medium enthaltenen Stickstoffquellen (Pepton, Trypton und Hefeextrakt) sowie das Natriumacetat, Spurenelemente (Mangansulfat und Eisensulfat) und das Magnesiumsulfat qualitativ und quantitativ auf ihre Relevanz für die Kultivierung getestet worden. Des Weiteren sind die Einflüsse verschiedener Glucosestartkonzentration für die beiden Bakterienspezies bestimmt worden, um Optimalwerte für weitere Experimente zu definieren. Hinsichtlich einer möglichen großtechnischen Anwendung für die Produktion von D-Lactat sind als maßgebliche Ergebnisparameter die Ausbeute, die Produktendkonzentration, die Lag-Phase der Bakterien (Übergang zur exponentiellen Phase) und der Produktivität (P_{\max} und die Gesamtproduktivität) evaluiert worden.

3.4.1 Untersuchung verschiedener Stickstoffquellen zur Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus*

Zur Bestimmung einer Standard-Stickstoffquelle für zukünftige Experimente wurden Hefeextrakt, Trypton und Pepton/ Trypton auf ihre Eignung getestet. Um die verschiedenen N-Quellen miteinander vergleichen zu können, wurde in den Experimenten der Stickstoffgehalt auf 9,5 %, entsprechend 10,0 g/l Hefeextrakt referenziert. Des Weiteren wurde die Gesamtproduktivität in g/(l·h) nach 96 h (zu diesem Zeitpunkt geht der aktuelle Wert gegen Null) Kultivierungsdauer und die Ausbeute [%] als Vergleichskriterium für die Experimente gewählt (Abbildung 3.12).

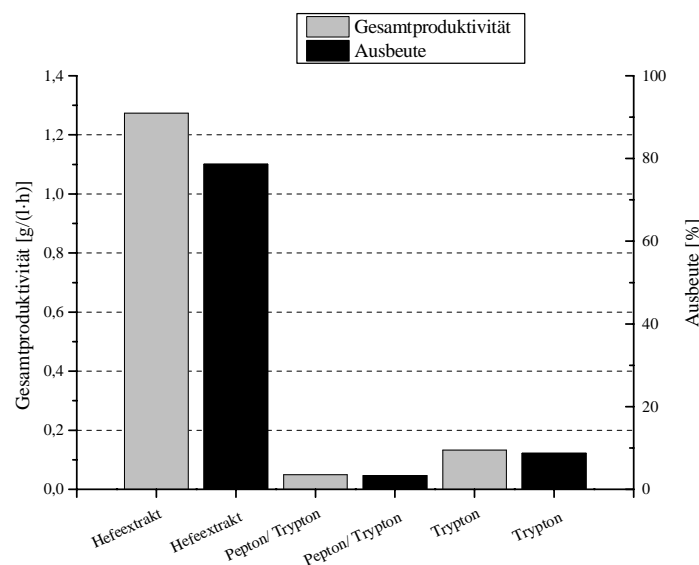


Abbildung 3.12: Einfluss der Stickstoffquellen für den *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 161,9 g/l Glucose bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD₆₀₅ von 0,4. Trypton und Pepton/ Trypton wurden entsprechend des Stickstoffgehalts (9,5 %) von 10,0 g/l Hefeextrakt eingesetzt. Neutralisationsmittel: 60,0 g/l CaCO₃.

Aus der Abbildung 3.12 wird ersichtlich, dass es deutliche Unterschiede bezüglich der getesteten Stickstoffquellen anhand der Gesamtproduktivität gibt. Die Experimente mit Hefeextrakt (HE) erreichten mit durchschnittlich 1,27 g/(l·h) den höchsten Wert, wo hingegen die Experimente mit Trypton (TR) bzw. Pepton/ Trypton (PT) niedrige Werte mit 0,05 und 0,13 g/(l·h) aufweisen. Darüber hinaus wird auch mit Hefeextrakt die höchste Ausbeute von knapp 80,0 % erzielt (bei 13,2 g/l Glucoserestkonzentration), während die Experimente mit TR bzw. mit PT im Vergleich kaum 10,0 % Ausbeute erreichen. Die Produktendkonzentrationen, die Restglucose und die Selektivität für die Experimente sind Tabelle 3.1 in der zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Einfluss verschiedener Stickstoffquellen für den *Sporolactobacillus inulinus*.

Stickstoffquelle	D-Lactat [g/l] nach 96 h	Restglucose [g/l] nach 96 h	Selektivität [%]
Hefeextrakt	122,2	13,2	85,0
Pepton/ Trypton	4,7	151,7	38,2
Trypton	12,8	140,8	54,9

Diese Ergebnisse können möglicherweise damit erklärt werden, dass die Bakterien eine Präferenz hinsichtlich der molaren Massen, der ihnen angebotenen Proteine und Peptide besitzen und dass diese möglicherweise quantitativ eher im Hefeextrakt vorhanden sind. Ferner könnte auch die Verfügbarkeit von essentiellen Enzym-Co-Faktoren (wie z.B. Vitamine) für die deutlichen Unterschiede der Ergebnisse einen Einfluss haben. Des Weiteren sollte in folgenden Experimenten die Konzentration des Hefeextrakts variiert werden, um eine Optimalkonzentration für weitere Kultivierungsexperimente anhand der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit bzw. der maximalen Produktivität zu bestimmen.

3.4.2 Bestimmung der Optimalkonzentration des Hefeextrakts zur Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus*

Für die Bestimmung einer Optimalkonzentration bezüglich des Hefeextrakts (HE) wurden sechs Experimente mit unterschiedlichen HE-Startkonzentrationen (5,0 g/l, 7,0 g/l, 10,0 g/l, 20,0 g/l, 30,0 g/l und 40,0 g/l) mit Hilfe der maximalen Produktivität (P_{\max}) nach 136 h miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der Abbildung 3.13 dargestellt.

Die Abbildung zeigt deutlich, dass die Bakterien ein Optimum bzgl. der maximalen Produktivität von 2,57 g/(l·h) bei einer Hefeextraktkonzentration 20,0 g/l besitzen. Darüber hinaus werden die nächst höheren P_{\max} -Werte bei 10,0 und 30,0 g/l HE, mit 2,12 bzw. 2,02 g/(L·h) erzielt. Berücksichtigt man zudem die Werte der Produktenkonzentration, Ausbeute und Selektivität (nach 136 h, siehe Tabelle 3.2) so ist ersichtlich, dass diese Werte proportional mit der eingesetzten Hefeextraktkonzentration leicht

ansteigen. Allerdings würde die Steigerung der HE-Startkonzentration auch die Produktionskosten immens erhöhen, da das Hefeextrakt für den Prozess den größten Kostenfaktor darstellt (siehe Kapitel 1.4, Seite 13).

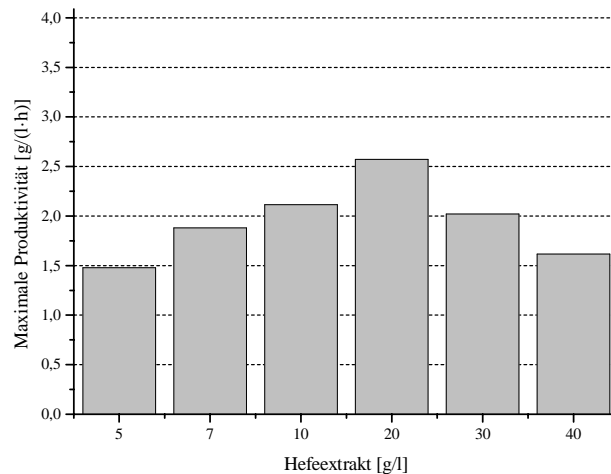


Abbildung 3.13: Einfluss der Variation der Hefeextraktkonzentration für den *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 168,3 g/l Glucose bei 35 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD₆₀₅ von 0,4. Neutralisationsmittel: 60,0 g/l CaCO₃.

Tabelle 3.2: Einfluss der Hefeextraktkonzentration für den *Sporolactobacillus inulinus*.

Hefeextrakt-Konzentration [g/l]	D-Lactat [g/l] nach 136 h	Gesamt-Produktivität [g/(l·h)]	D-Lactat nach 48 h	Ausbeute [%]	Selektivität [%]
5,0	101,0	0,74	6,1	60,2	60,5
7,0	106,9	0,79	10,1	63,5	64,5
10,0	104,2	0,77	10,5	61,5	61,9
20,0	111,8	0,82	10,9	66,0	67,0
30,0	116,1	0,85	10,7	69,1	70,0
40,0	116,0	0,85	6,6	70,0	71,0

Aufgrund dieses potentiellen Kostenfaktors und in Anbetracht der P_{\max} -Werte aus der Abbildung 3.13, wurde weiterhin mit 10,0 g/l HE als Standardkonzentration gearbeitet (Liniendiagramm, siehe Abbildung 5.4 im Anhang, Seite 118). An dieser Stelle muss jedoch angemerkt werden, dass die Experimente aufgrund einer Fehlfunktion des Inkubators bei 35 °C prozessiert worden sind, sodass die absoluten Werte bezüglich der Gesamtproduktivität aus der Abbildung 3.12 nicht mit den Werten aus der Tabelle 3.2 direkt vergleichbar sind und somit nur qualitative Aussagen getroffen werden können.

Des Weiteren sind die relativ niedrigen Ausbeute- und Selektivitätswerte in der Tabelle 3.2 darauf zurückzuführen, dass über die Gesamtprozessdauer von 136 h überproportional viele Nebenprodukte gebildet worden sind. Für den Ansatz mit 40,0 g/l Hefeextrakt betragen diese in Summe durchschnittlich

33,3 g/l, wobei 18,5 g/l Acetat, 9,2 g/l Formiat und 5,6 g/l Propionat von den Bakterien gebildet worden sind. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die suboptimale Inkubationstemperatur (35 °C) gewesen sein, da der Selektivitätswert (siehe Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 bei jeweils 10,0 g/l HE) bei einer Inkubationstemperatur von 38 °C um vergleichsweise 23,5 % höher ist als bei einer Temperatur von 35 °C.

3.4.3 Untersuchung verschiedener Stickstoffquellen zur Kultivierung des *Sporolactobacillus putidus*

Die Experimente zur Untersuchung der N-Quellen HE, TR und PT für den *Sporolactobacillus putidus* sind analog zu den Experimenten hinsichtlich des *Sporolactobacillus inulinus* durchgeführt worden. Der Stickstoffgehalt der getesteten N-Quellen wurde ebenfalls auf 10,0 g/l HE (9,5 %) referenziert. Die Ergebnisse dieser Experimente wurden anhand der Gesamtproduktivität [g/(l·h)] und der Ausbeute [%] nach 93 h für die Ansätze mit HE sowie nach 161 h (nahezu vollständiger Glucoseumsatz) für die Ansätze mit TR und PT in der Abbildung 3.14 dargestellt.

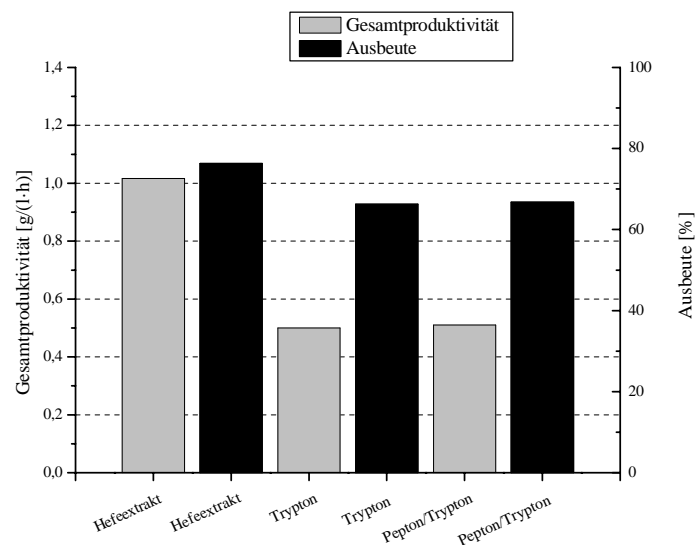


Abbildung 3.14: Einfluss der Stickstoffquellen für den *Sporolactobacillus putidus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 122,1 g/l Glucose bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD₆₀₅ von 0,4. Trypton und Pepton/ Trypton wurden entsprechend des Stickstoffgehalts (9,5 %) von 10,0 g/l Hefeextrakt eingesetzt. Neutralisationsmittel: 60,0 g/l CaCO₃.

Aus der Abbildung kann entnommen werden, dass hinsichtlich der getesteten Stickstoffquellen, dass das HE mit einer Gesamtproduktivität von 1,02 g/(l·h) deutlich höhere Werte erreicht als das Trypton mit 0,50 g/(l·h) bzw. das Trypton/ Pepton mit 0,51 g/(l·h). Des Weiteren erreichen die Experimente mit HE eine Ausbeute von ca. 80,0 %, während die Ansätze mit Trypton und Trypton/ Pepton ungefähr

66,0 % Ausbeute erzielen. Zusätzlich sind die Produktendkonzentrationen und die Selektivität im Bezug auf die jeweiligen N-Quellen in der Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Tabelle 3.3: Einfluss verschiedener Stickstoffquellen für den *Sporolactobacillus putidus*.

Stickstoffquelle	D-Lactat [g/l] nach 96 h	Restglucose [g/l] nach 96 h	Selektivität [%]
Hefeextrakt	94,5	9,2	81,1
Trypton	80,5 ^A	1,0 ^A	66,8 ^A
Pepton/ Trypton	82,0 ^A	4,6 ^A	69,3 ^A

^A: Evaluierung der Werte nach 161 h.

Die geringeren Selektivitätswerte für die Ansätze mit TR und PT (im Vergleich zu HE) können bei diesen Experimenten mit einer Zunahme der Nebenproduktbildung erklärt werden. Für den Ansatz mit Trypton wurden nach 161 h durchschnittlich 23,3 g/l Nebenprodukte gebildet, wobei für die Experimente mit HE durchschnittlich 10,4 g/l an Nebenprodukten bestimmt werden konnte. Auch hier können die Variabilität der molaren Massen der Proteine/ Peptide und/ oder die Verfügbarkeit an Vitaminen im Medium die möglichen Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Des Weiteren sollte in folgenden Experimenten ebenfalls die optimale HE-Startkonzentration anhand der maximalen Produktivität für den *S. putidus* ermittelt werden.

3.4.4 Bestimmung der Optimalkonzentration des Hefeextrakts zur Kultivierung des *Sporolactobacillus putidus*

Analog zur Bestimmung einer Optimalkonzentration bezüglich des HE für den *Sporolactobacillus inulinus*, wurden vier Experimente mit unterschiedlichen HE-Startkonzentrationen (5,0 g/l, 7,0 g/l, 10,0 g/l und 20,0 g/l) für den *Sporolactobacillus putidus* prozessiert. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der Abbildung 3.15 unter Zuhilfenahme maximalen Produktivität (P_{\max}) skizziert.

Aus der Abbildung geht hervor, dass die Erhöhung der HE-Startkonzentration von 5,0 g/l bis 20,0 g/l zu einer sukzessiven Steigerung der maximalen Produktivität führt. So können P_{\max} -Werte von 1,95 g/(l·h) bei 5,0 g/l HE und 2,34 g/(l·h) mit 7,0 g/l HE ermittelt werden. Zudem führt eine Erhöhung der HE-konzentration auf 10,0 g/l zu einer Steigerung von P_{\max} auf 3,04 g/(l·h). Ein Maximum wird diesbezüglich bei 20,0 g/l HE mit 3,79 g/(l·h) erreicht. Bei der Betrachtung der Tabelle 3.4 fällt auf, dass mit der Steigerung der Hefeextraktkonzentration, tendenziell die Produktkonzentration, die Ausbeute und die Selektivitätswerte leicht erhöht werden können.

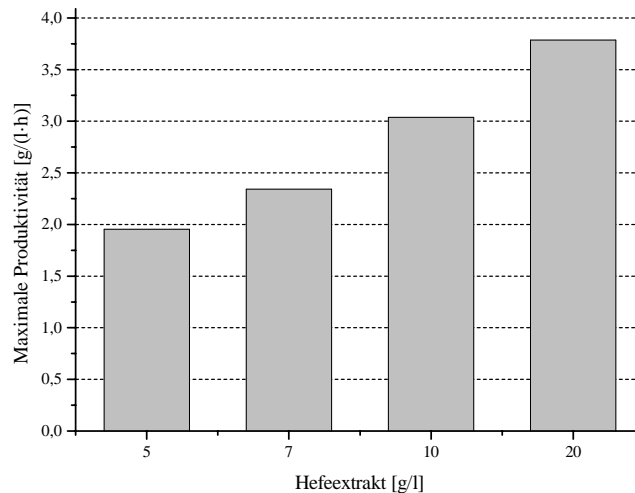


Abbildung 3.15: Einfluss der Variation der Hefeextraktkonzentration für den *Sporolactobacillus putidus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 123,4 g/l Glucose bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum (OD_{605} der Vorkultur von 0,4). Neutralisationsmittel: 60,0 g/l $CaCO_3$.

Tabelle 3.4: Einfluss der Hefeextraktkonzentration für den *Sporolactobacillus putidus*.

Hefeextrakt-Konzentration [g/l]	D-Lactat [g/l] nach 96 h	Gesamt-Produktivität [g/(l·h)]	D-Lactat nach 48 h	Ausbeute [%]	Selektivität [%]
5,0	85,3	0,88	18,6	69,1	69,2
7,0	89,3	0,93	21,8	72,2	72,3
10,0	92,2	0,96	21,8	74,7	74,8
20,0	94,8	0,99	8,5	76,8	76,9

Andererseits lassen die Daten erkennen, dass die Lag-Phase der Bakterien (D-Lactat nach 48 h) bei 20,0 g/l HE deutlich verlängert wird. Darüber hinaus wäre eine höhere Hefeextraktkonzentration angesichts dieser Daten aufgrund des Kostenfaktors unverhältnismäßig. Anhand der P_{\max} -Werte und unter Berücksichtigung der Lag-Phase der Bakterien wurde in weiteren Kultivierungsexperimenten, analog zum *Sporolactobacillus inulinus*, weiterhin 10,0 g/l HE als Startkonzentration verwendet (Übergang zur exponentiellen Phase der Bakterien, siehe Abbildung 5.6 im Anhang, Seite 119).

Schlussfolgerung: Ein Vergleich der Experimente bezüglich der Stickstoffquellen beider *Sporolactobacillus* Spezies zeigt, dass der *Sporolactobacillus inulinus* weniger anpassungsfähig hinsichtlich der eingesetzten N-Quelle ist als der *Sporolactobacillus putidus*. So konnte für den *Sporolactobacillus inulinus* mit TR bzw. PT nur eine sehr geringe Gesamtproduktivität erzielt werden als vergleichsweise mit Hefeextrakt (1,27 g/(l·h)). Hingegen konnte der *Sporolactobacillus putidus* mit TR und PT die Hälfte der Gesamtproduktivität in Relation zum Hefeextrakt erreichen. Ferner konnten mit TR und PT Ausbeuten von ca. 66,0 % erzielt werden, demgegenüber konnte mit HE ca. 80,0 % Ausbeute realisiert werden. Weiterhin zeigt die Variation der initialen HE-Konzentration, dass die Produktivität (P_{\max}) bzw. die Wachstumsgeschwindigkeit beider *Sporolactobacillus* Spezies wesentlich

von der HE-Konzentration beeinflusst werden kann. Unter Berücksichtigung der Tabellenwerte (Tabelle 3.2 und Tabelle 3.4), des Kostenfaktors (HE) und der P_{\max} -Werte wurde dennoch bei beiden Spezies weiterhin mit 10,0 g/l Hefeextrakt gearbeitet.

3.4.5 Untersuchung der Glucosestartkonzentrationen für den *Sporolactobacillus inulinus*

Als Parameter für die Bestimmung einer Standard-Glucosestartkonzentration wurde die Gesamtproduktivität [g/(l·h)] nach Ende der Kultivierung gegen die eingesetzte Glucosestartkonzentrationen (100,0, 130,0, 140,0, 150,0, 160,0, 200,0, 230,0 und 270,0 g/l) in der Abbildung 3.16 aufgetragen. Für die Ansätze mit 100 g/l Glucose wurde das Substrat innerhalb von 64 h vollständig verbraucht, während die Kultivierungen mit 130,0 – 230,0 g/l Glucose aufgrund der geringen aktuellen Produktivität nach 96 h beendet wurden. Ferner wurde das Experiment mit 270,0 g/l Glucose nach 136 h ebenfalls infolge der niedrigen aktuellen Produktivität terminiert.

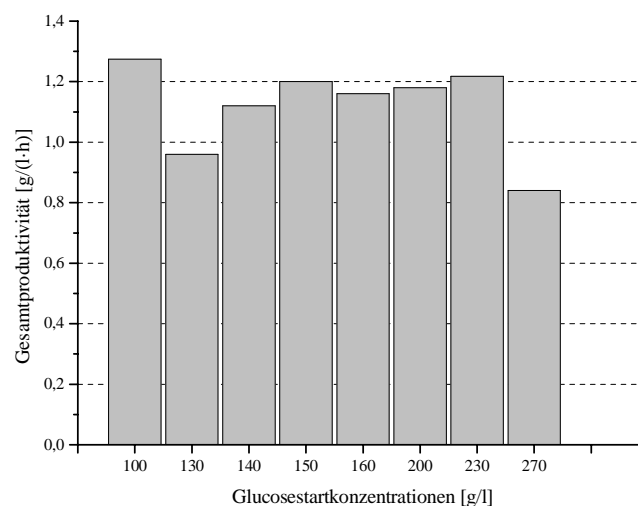


Abbildung 3.16: Einfluss der Variation der Glucosestartkonzentration für den *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 60,0 g/l CaCO_3 (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 0,4.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass ein Maximalwert für die Gesamtproduktivität von 1,27 g/(l·h) für die Ansätze mit 100,0 g/l Glucose bestimmt werden kann. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass die Gesamtproduktivität über einen großen Konzentrationsbereich (140,0 - 230,0 g/l) nahezu konstant bleibt. Im Vergleich präsentieren die Ergebnisse mit einer Glucosestartkonzentration mit 130,0 g/l eine leicht verringerte Produktivität, was möglicherweise mit einer suboptimalen Probenaufarbeitung (Ca-Lactat nicht vollständig hydrolysiert) erklärt werden kann. Lediglich die Gesamtproduktivität der Experimente mit einer Startkonzentration von 270,0 g/l Glucose zeigt mit 0,84 g/(l·h) eine signifikante Abweichung.

Diese Resultate verdeutlichen, dass die Bakterien relativ unempfindlich gegenüber einer Substratinhibition durch Glucose sind und somit auch potentiell hohe Glucosestartkonzentrationen eingesetzt werden können. Um darüber hinaus einen Standard-Glucose-Startwert bestimmen zu können, wurden zudem die Ergebniswerte der Ausbeute [%], die Dauer der Lag-Phase (Übergang zur exponentiellen Phase nach 40 h) der Bakterien und die Werte der Produktendkonzentration hinzugezogen. Diese Parameter sind in der Tabelle 3.5 aufgelistet.

Tabelle 3.5: Variation der Glucosestartkonzentration für den *Sporolactobacillus inulinus*.

Glucosestartkonzentration [g/l]	D-Lactat [g/l] nach 96 h	Ausbeute [%]	D-Lactat [g/l] nach 40 h
100,0	81,5 ^A	85,1 ^A	38,8
130,0	90,1	77,9	33,7
140,0	106,8	74,0	34,7
150,0	114,7	79,0	32,5
160,0	111,6	68,0	24,3
200,0	112,8	58,0	20,5
230,0	116,9	51,0	7,4
270,0	113,9 ^B	42,8 ^B	2,3

^A: Berechnung der Werte nach 64 h bei vollständigen Verbrauch der Glucose. ^B: Berechnung der Werte nach 136 h, da der Produktivitätswert gegen Null tendiert.

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, dass je höher die Glucosestartkonzentration (ab 160,0 g/l), desto länger ist der Übergang zur exponentiellen Phase der Bakterien (D-Lactatwerte nach 40 h) und desto geringer die Ausbeute an D-Lactat nach Ende der Kultivierung. Dieser Sachverhalt kann möglicherweise mit dem osmotischen Druck bei hohen Glucosekonzentrationen erklärt werden, wodurch die Zellen zu Beginn der Kultivierung maßgeblich bei der Reproduktion gehemmt werden.

Anhand der evaluierten Daten wurde für den *Sporolactobacillus inulinus* eine Glucosestartkonzentration von 150,0 g/l eingesetzt (grau hervorgehoben), da bei dieser Konzentration vergleichsweise hohe Werte hinsichtlich der Ausbeute und Endkonzentration (114,7 g/l) erzielt werden konnten. Zudem ist bei dieser Konzentration eine hohe Gesamtproduktivität mit 1,20 g/(l·h) in Relation zu den Ergebnissen in der Abbildung 3.16 erreicht worden (Liniendiagramme siehe Anhang, Abbildung 5.7, Seite 120).

3.4.6 Untersuchung der Glucosestartkonzentrationen für den *Sporolactobacillus putidus*

Als Parameter zur Bestimmung einer Standard-Glucosestartkonzentration für den *Sporolactobacillus putidus* wurde ebenfalls die Gesamtproduktivität [g/(l·h)] nach dem Ende der Kultivierung ermittelt. Dabei sind die Konzentrationen 100,0, 120,0, 130,0, 150,0, 160,0, 200,0, 230,0 g/l getestet worden. Die Experimente mit 100,0 g/l Glucose wurden infolge der kompletten Umsetzung des Substrates nach 64 h beendet. Die Kultivierungen mit 120,0 und 130,0 g/l Glucose wurden ebenfalls bei Vollumsatz der Glucose nach 96 h abgebrochen, wobei die Ansätze mit 150,0 – 230,0 g/l aufgrund der geringen aktuellen Produktivität nach 136 h beendet worden sind. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.17 dargestellt.

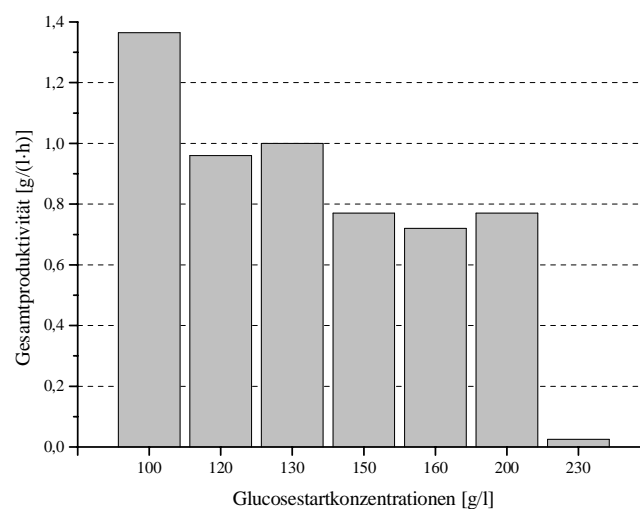


Abbildung 3.17: Einfluss der Variation der Glucosestartkonzentration für den *Sporolactobacillus putidus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 60,0 g/l CaCO_3 (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 0,4.

Der Abbildung 3.17 kann entnommen werden, dass je geringer die initial eingesetzte Glucose-Konzentration ist, desto höher ist die Gesamtproduktivität. So wiesen die Experimente mit einer Startkonzentration von 100,0 g/l Glucose den höchsten Wert von 1,36 g/(l·h) auf. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse mit 120,0 g/l und 130,0 g/l Glucose eine Produktivität von 0,96 und 0,99 g/(l·h). Wohingegen die Experimente ab 150,0 g/l Glucose deutlich niedrigere Werte aufweisen.

Des Weiteren findet ab 230,0 g/l keine wesentliche D-Lactatproduktion mehr statt. Um eine Standard-Glucosekonzentration zu bestimmen, wurden zudem die Ausbeute, die Produktendkonzentration und die Dauer der Lag-Phase der Bakterien (48 h) als Funktion der D-Lactatkonzentration evaluiert. Diese Werte sind in der Tabelle 3.6 aufgelistet. Weiterhin lassen die Daten in der Tabelle erkennen, dass je höher die Glucose-Start-Konzentration (ab 150,0 g/l), desto geringer ist die Ausbeute an D-Lactat und desto länger ist die Lag-Phase der Bakterien. Die niedrigeren Werte der Tabelle 3.6 und der Abbildung

3.17 (ab 150,0 g/l Glucose) deuten auf eine Substratinhibition hin, die möglicherweise mit der Zunahme des osmotischen Drucks auf die Zellen erklärt werden kann.

Tabelle 3.6: Variation der Glucosestartkonzentration für den *Sporolactobacillus putidus*.

Glucosestartkonzentration [g/l]	D-Lactat [g/l] nach 136 h	Ausbeute [%]	D-Lactat [g/l] nach 48 h
100,0	87,3 ^A	88,5 ^A	33.4
120,0	92.2 ^B	77,0 ^B	21.8
130,0	95.9 ^B	74,0 ^B	19.0
150,0	104,8	71,3	5.9
160,0	98,1	59,7	0.5
200,0	105,9	53,7	1.0
230,0	0.1 ^C	-	0.1 ^C

^A: Berechnung der Werte nach 64 h bei vollständigen Verbrauch der Glucose. ^B: Berechnung der Werte nach 96 h bei vollständigen Verbrauch der Glucose.

Um darüber hinaus eine technisch relevante Substratkonzentration einzusetzen, wurde für weitere Experimente eine Standard-Glucosekonzentration zwischen 120,0 und 130,0 g/l gewählt (grau hervorgehoben), da hier im Vergleich zu den Experimenten mit höherer Glucosekonzentration, eine höhere Ausbeute, eine vergleichbare Produktendkonzentration und eine verkürzte Lag-Phase erzielt werden konnte (Siehe Abbildung 5.8, Seite 120).

Schlussfolgerung: Ein Vergleich beider Stämme in Bezug auf die Zuckerstartkonzentration zeigt, dass der *Sporolactobacillus inulinus* deutlich weniger Anfällig gegenüber einer Substratinhibition bei höheren Zuckerkonzentrationen ist als der *Sporolactobacillus putidus*. Während der *Sporolactobacillus inulinus* über einen breiten Konzentrationsbereich ähnliche Produktivitätswerte erreicht, zeigen die Werte für den *Sporolactobacillus putidus* eine deutliche Abnahme der Produktivität mit steigender Zuckerstartkonzentration. Vergleicht man darüber hinaus den Übergang zur exponentiellen Phase der Bakterien in Abhängigkeit der initialen Zuckerkonzentration, so ist erkennbar, dass bei dem *Sporolactobacillus inulinus* (D-Lactatkonzentration nach 40 h) erst ab 160,0 g/l Glucose eine tendenzielle Verlängerung der Lag-Phase auftritt. Wohingegen beim *Sporolactobacillus putidus* (D-Lactatkonzentration nach 48 h) der Übergang zu exponentiellen Phase bei Glucosekonzentrationen über 130,0 g/l deutlich verlängert wird. Wang *et al.* (2011) hat bereits ähnliche Experimente zum Einfluss der Glucosestartkonzentration für den *Sporolactobacillus inulinus* CASD durchgeführt [68]. Die Autoren dieser Publikation kamen zu demselben Schluss, dass sich Glucosekonzentrationen über 150,0 g/l negativ auf die D-Lactatproduktion der Bakterien auswirken. Allerdings sind die Untersuchungen nur über einen Zeitraum von 24 h und mit teils abweichenden Kultivierungsbedingungen gemacht worden, wodurch die Resultate der Experimente nur qualitativ mit den hier erzielten Ergebnissen verglichen werden können.

3.4.7 Einfluss von Natriumacetat auf die Kultivierung der *Sporolactobacillus* Spezies

Der Hintergrund dieser Experimente beruht auf der Publikation von Liu *et al.* (2012), in welcher die Adaption der Glykolyse hinsichtlich des Wachstums mit Acetat im Medium für den *Sporolactobacillus inulinus* Y2-8 untersucht worden ist [59]. Die wesentlichen Erkenntnisse der Arbeit sind zum einen, dass Natriumacetat (NaOAc) bei einer Massenkonzentration von 2,0 g/l im Medium den Glucoseverbrauch der Zellen aufgrund einer Stimulation der Aktivität von den Enzymen Phosphofructokinase und Hexokinase steigert, während Konzentrationen ab 5,0 g/l NaOAc einen negativen Effekt auf den Glucoseverbrauch ausüben. Zum anderen soll das zugesetzte NaOAc die Nebenproduktbildung der Bakterien bzgl. des Acetats minimieren und somit die Selektivität gegenüber dem Hauptprodukt D-Lactat erhöhen. Die Autoren führen ihre Erkenntnisse auf den Einfluss des Acetats auf den Phospho-Trans-Acetylase-Acetatkinase-Stoffwechselweg (PTA-ACK-Weg) bzw. dessen Einfluss auf die Glykolyse (siehe Kapitel 1.3.4, Seite 11) zurück [59].

3.4.7.1 Einfluss von Natriumacetat auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus*

Zur Untersuchung des Einflusses des Acetats auf die Kultivierung der Zellen sind sechs verschiedene Experimente gemacht worden. Einen Kontrollansatz ohne NaOAc und fünf weitere Ansätze mit Konzentrationen von 2,0 g/l bis 10,0 g/l NaOAc (in zweier Inkrementen). Die Ergebnisse der Experimente sind anhand des maximalen Glucoseumsatzes (U_{\max}) in der Abbildung 3.18 dargestellt.

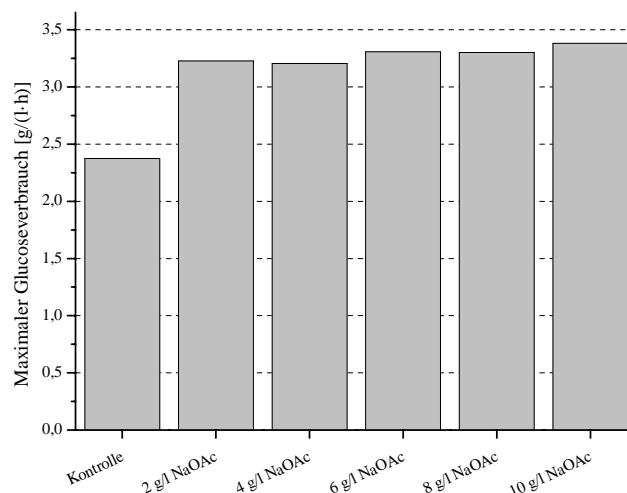


Abbildung 3.18: Variation der NaOAc-Konzentration für den *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 150,0 g/l Glucose, 60,0 g/l CaCO_3 (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 0,4.

Die Abbildung verdeutlicht, dass die Zugabe Acetat einen wesentlichen Einfluss auf den maximalen Glucoseumsatz der Bakterien hat. So beträgt die Differenz des Verbrauchswerts zwischen dem Ansatz mit 2,0 g/l NaOAc und der Kontrolle 0,86 g/(l·h). Darüber hinaus ist erkennbar, dass bei steigender Natriumacetat-Konzentration, U_{\max} nur diskret weiter ansteigt (auf maximal 3,38 g/(l·h) bei 10,0 g/l NaOAc). Des Weiteren ist mit Hilfe dieser Experimente untersucht worden, ob durch die Zugabe von NaOAc die Nebenproduktbildung minimiert werden kann bzw. die Selektivität hinsichtlich des Hauptprodukts erhöht werden kann. Diese Werte wurden nach Kultivierungsende bei 72 h bzw. 96 h ermittelt und sind in der Tabelle 3.7 aufgeführt (Verringerung der aktuellen Produktivitätswerte gegen Null, siehe Anhang 5.7, Seite 121).

Tabelle 3.7: Ergebnisse der NaOAc-Variation im Medium für den *Sporolactobacillus inulinus*.

Ansatz NaOAc [g/l]	D-Lactat [g/l] nach 72 h	Gesamtproduktivität [g/(l·h)] nach 72 h	Selektivität [%]	Produziertes Acetat [g/l]
0,0 (Kontrolle)	119,9 ^A	1,25 ^A	89,0 ^A	1,9
2,0	119,3 ^A	1,24 ^A	88,8 ^A	2,2
4,0	117,8	1,64	86,2	2,3
6,0	114,3	1,59	83,6	2,3
8,0	115,0	1,60	82,4	2,9
10,0	118,7	1,65	82,0	4,0

^A: Berechnung der Werte nach 96 h, da der Produktivitätswert zu diesem Zeitpunkt gegen Null sinkt. Produziertes Acetat: Differenz der Acetatkonzentration nach Beendigung des Experiments und zu Beginn des Experiments.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die Gesamtproduktivität durch NaOAc im Medium (ab 4,0 g/l) um durchschnittlich 0,37 g/(l·h) oder 23,0 % gesteigert werden kann. Zudem weisen alle Ansätze, unabhängig von Natriumacetatkonzentration, ähnliche Selektivitätswerte bezüglich D-Lactat auf, wobei ab 4,0 g/l NaOAc die Selektivität geringfügig abnimmt. Zusätzlich ist zu erkennen, dass die Zugabe von NaOAc die Nebenproduktbildung nicht reduziert, sondern minimal erhöht. So nimmt die Nebenproduktbildung (Acetat) der Bakterien im Vergleich zur Kontrolle um 2,1 g/l bei 10,0 g/l NaOAc zu.

Dieser Befund verdeutlicht, dass der PTA-ACK-Weg durch NaOAc im Medium nicht effektiv supprimiert, sondern möglicherweise durch ein positives Feedback gesteigert werden kann. Des Weiteren scheint die Zugabe von NaOAc keinen Einfluss auf die Propionat- und Formiatbildung der Bakterien zu haben. Formiat bzw. Ameisensäure konnte nur, unabhängig von der NaOAc-Konzentration, bei 72 h über alle Ansätze mit durchschnittlich 24,4 g/l detektiert werden. Wohingegen für die Kontrolle und bei 2,0 g/l NaOAc im Medium, nach 96 h kein messbares Signal für Formiat bzw. Ameisensäure im HPLC-Chromatogramm vorhanden war.

Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass Formiat von den Bakterien enzymatisch zu CO₂ und H₂ abgebaut

wird und somit nicht bei jedem Probenahmepunkt mittels HPLC detektiert werden kann. Des Weiteren ist es möglich, dass Formiat aufgrund des geringen Molekulargewichts (45,0 g/mol) zusammen mit CO₂ (44,0 g/mol) durch das Schütteln (120 RPM) ausgetrieben wird. Auch im Bezug auf die Propionatbildung kann kein Einfluss durch die Zugabe von NaOAc beobachtet werden. Für Propionat konnte nach 72 h eine durchschnittliche Konzentration von 0,45 g/l (unabhängig von der NaOAc-Zugabe) ermittelt werden.

3.4.7.2 Einfluss von Natriumacetat auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus putidus*

Die Untersuchungen zum NaOAc-Einfluss auf den *Sporolactobacillus putidus* sind einheitlich zu den vorausgegangenen Experimenten mit dem *Sporolactobacillus inulinus* durchgeführt worden. Die Experimente beinhalten ebenfalls einen Kontrollansatz ohne NaOAc im Medium und weitere Ansätze mit NaOAc-Konzentrationen von 2,0 g/l bis 10,0 g/l (in zweier Inkrementen). Die Ergebnisse dieser Experimente sind unter Zuhilfenahme von U_{\max} [g/(l·h)] in der Abbildung 3.19 aufgetragen.

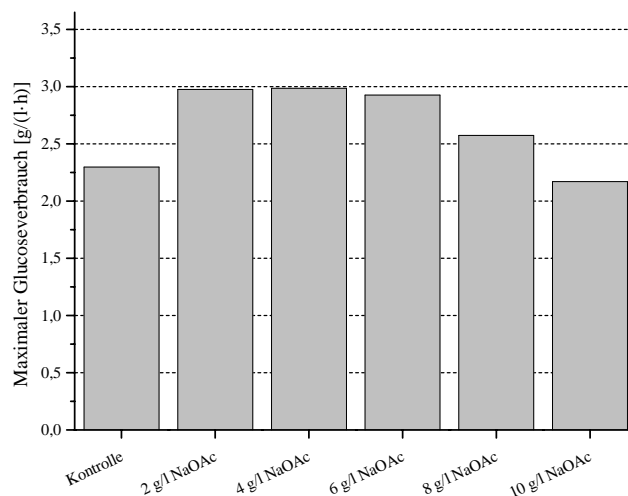


Abbildung 3.19: Variation der NaOAc-Konzentration für den *Sporolactobacillus putidus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 130,0 g/l Glucose, 60,0 g/l CaCO₃ (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD₆₀₅ von 0,4.

Aus der Abbildung geht hervor, dass die Zugabe von Acetat den maximalen Glucoseverbrauch der Bakterien erhöht. So beträgt die Steigerung des maximalen Glucoseverbrauch bei 2,0 g/l NaOAc in Relation zur Kontrolle 0,68 g/(l·h). Des Weiteren ist zu erkennen, dass der Glucoseverbrauch tendenziell mit steigender Acetatkonzentration (ab 6,0 g/l) im Medium wieder abnimmt. So erzielt der Ansatz mit 10,0 g/l NaOAc einen um 0,13 g/(l·h) verminderten U_{\max} -Wert als der Kontrollansatz. Zieht man darüber hinaus die Gesamtproduktivität nach 92 h bzw. 160 h (Ende der Kultivierung aufgrund von

aktuellen Produktivitätswerten nahe Null) aus der Tabelle 3.8 hinzu, so fällt auf, dass die Werte durch Acetat-Zugabe (2,0 – 6,0 g/l) im Medium gesteigert werden können.

Tabelle 3.8: Ergebnisse der NaOAc-Variation im Medium für den *Sporolactobacillus putidus*.

Ansatz NaOAc [g/l]	D-Lactat [g/l] nach 92 h	Gesamtproduktivität [g/(l·h)] nach 92 h	Selektivität [%]	Produziertes Acetat [g/l]
0,0 (Kontrolle)	108,2 ^A	0,68 ^A	88,6 ^A	5,1
2,0	103,3	1,12	88,5	5,2
4,0	101,3	1,10	86,3	4,6
6,0	93,7	1,01	85,5	6,1
8,0	106,3 ^A	0,66 ^A	82,6 ^A	6,3
10,0	102,7 ^A	0,64 ^A	84,0 ^A	6,9

^A: Berechnung der Werte nach 160 h, da der Produktivitätswert zu diesem Zeitpunkt gegen Null sinkt oder Vollumsatz erreicht wurde (8,0 und 10,0 g/l NaOAc). Produziertes Acetat: Differenz der Acetatkonzentration nach Beendigung des Experiments und zu Beginn des Experiments.

Der Kontrollansatz liegt dabei mit 0,44 g/(l·h) oder 39,0 % deutlich unter dem höchsten Wert mit 2,0 g/l NaOAc. Dieser Effekt wird ab einer Konzentration von 8,0 g/l relativiert und die Werte für die Gesamtproduktivität werden wieder geringer. Diese Ergebnisse legen nahe, dass das Acetat (zwischen 2,0 und 6,0 g/l) eine effektive Stimulanz bezüglich der Produktivität bzw. des Glykolysestoffwechsels der Bakterien ist (siehe Abbildung 5.10, Seite 121).

Des Weiteren kann den Daten entnommen werden, dass die Selektivität bezüglich D-Lactat mit steigender NaOAc-Konzentration tendenziell abnimmt. Dies korreliert mit der Tatsache, dass die Acetatbildung bei dieser Konzentration ebenfalls ansteigt. Im Bezug auf die Nebenprodukte Formiat und Propionat konnte hier ebenfalls kein Einfluss durch NaOAc festgestellt werden. Formiat bzw. Ameisensäure konnte zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung gemessen werden, während Propionat, unabhängig von der NaOAc-Zugabe, mit durchschnittlich 3,2 g/l im Medium (nach Ende der Kultivierung) vorhanden war.

Schlussfolgerung: Ein Vergleich der beiden *Sporolactobacillus* Spezies zeigt, dass NaOAc im Medium den Glucoseverbrauch steigern kann. Zudem kann die Gesamtproduktivität zwischen 2,0 - 6,0 g/l NaOAc für den *Sporolactobacillus putidus* erhöht werden, während dieser Effekt bei dem *Sporolactobacillus inulinus* konzentrationsabhängig zwischen 4,0 – 10,0 g/l NaOAc auftritt. Darüber hinaus nimmt die Selektivität mit steigender NaOAc-Konzentration ab, welche im Zusammenhang mit der erhöhten Nebenproduktbildung (Acetat) beider Spezies einhergeht und die D-Lactatendkonzentration somit nicht signifikant gesteigert werden kann. Die von Liu *et al.* (2012) beschriebene Erhöhung der Selektivität durch verringerte Nebenproduktbildung bei Zugabe von 2,0 g/l Natriumacetat ins Medium konnte somit nicht bestätigt werden [59]. Jedoch ist die Tatsache interessant,

dass beide Spezies sehr resistent gegenüber höhere Acetatkonzentrationen sind. So wird z.B. bei der enzymatischen Hydrolyse von Cellulose und Hemicellulosen aus Weizenkaff (Anders *et al.* 2014) ein Acetat-Puffer verwendet, dessen Rückstände im Hydrolysat möglicherweise andere Mikroorganismen in höheren Konzentrationen hemmen könnte [87].

Infolge der Steigerung des Glucoseverbrauchs, wurde für die weiteren Experimente im Erlenmeyerkolben eine Konzentration von 2,0 g/l NaOAc für beide Spezies verwendet. Angesichts der verringerten Selektivitätswerte bei NaOAc-Zugabe, wurde für Reaktorexperimente gänzlich auf die Supplementierung mit NaOAc verzichtet. Hinsichtlich eines großtechnischen Prozesses können zudem weitere Kosten für Chemikalien eingespart werden.

3.4.8 Einfluss von Spurenelementen und Magnesiumsulfat auf die Kultivierung der *Sporolactobacillus* Spezies

Hinsichtlich der Literatur sind keine Daten verfügbar, die die Einflüsse der Salzkomponenten im GYP-Medium auf die Kultivierung der *Sporolactobacillus* Spezies untersucht haben. Lediglich Kitahara und Suzuki (1963) geben an, dass Mangansulfat bei einer Konzentration von 0,1 mM die Sporulation der Bakterien fördern kann [84]. Die Experimente zur Untersuchung der Einflüsse der Spurenelemente (10,0 mg/l NaCl, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und $\text{Fe(II)SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) und des Magnesiumsulfats (200,0 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) haben das Ziel herauszufinden, welche Kationen für die Kultivierung der *Sporolactobacillus* Spezies essentiell sind.

3.4.8.1 Einfluss von Spurenelementen und Magnesiumsulfat auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus*

Zur Bestimmung der Einflüsse der Spurenelemente und Salze des GYP-Mediums sind drei verschiedene Ansätze prozessiert worden. Hierzu wurde zunächst ein Kontrollexperiment mit allen Salzkomponenten, bestehend aus Magnesiumsulfat und den Spurenelementen, angesetzt. In einem weiteren Ansatz wurde unter Abwesenheit des Magnesiumsulfats gearbeitet und im dritten Ansatz ist auf die Spurenelemente verzichtet worden. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.20 für den *Sporolactobacillus inulinus* anhand der Gesamtproduktivität [g/(l·h)] nach 93 h sowie die D-Lactatkonzentration [g/l] nach 40 h (als Maß für die Lag-Phase) für die Ansätze veranschaulicht.

Aus der Abbildung 3.20 ist ersichtlich, dass das Magnesiumsulfat nur einen geringen Einfluss auf die Produktivität der Bakterien besitzt. So beträgt die Differenz des Kontrollwertes mit dem Ansatz ohne Magnesiumsulfat nur 0,14 g/(l·h) oder 11,0 %. Im Vergleich erzielt der Ansatz ohne Spurenelemente, nur eine Gesamtproduktivität von 0,35 g/(l·h). Dies deutet darauf hin, dass die enthaltenen Mangan-

und/ oder Eisen(II)-Kationen für die Kultivierung der Bakterien essentiell sind und den größten Einfluss auf die D-Lactatproduktion haben.

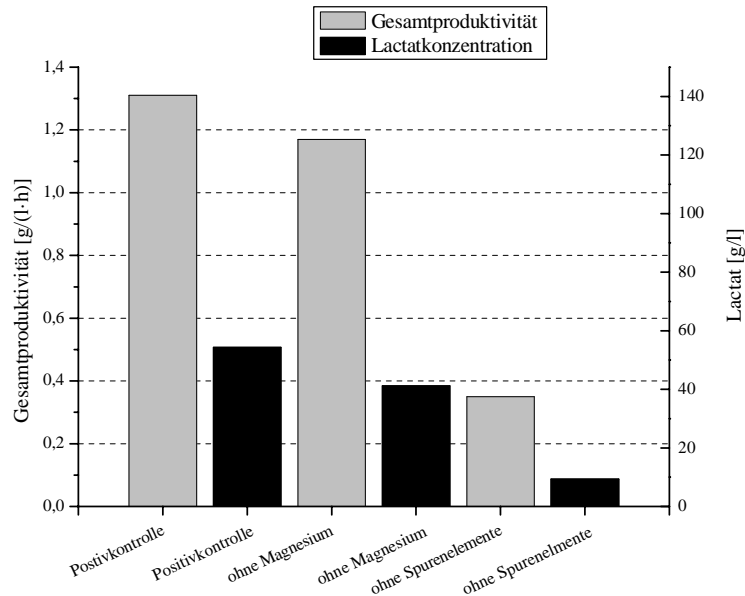


Abbildung 3.20: Einfluss der Salze und Spurenelemente hinsichtlich des *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 150,0 g/l Glucose, 60,0 g/l CaCO_3 (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 0,4.

Des Weiteren bestätigt der Übergang zur exponentiellen Phase der Bakterien anhand der D-Lactatkonzentrationen nach 40 Stunden diesem Befund. So sind im Kontrollansatz 54,3 g/l Lactat nach 40 Stunden produziert worden, während ohne Magnesiumsulfat, 41,2 g/l D-Lactat vorliegen. Im Ansatz ohne Spurenelemente konnten im hingegen nur 9,4 g/l D-Lactat zu diesem Zeitpunkt gemessen werden. Diese Ergebnisse können möglicherweise damit begründet werden, dass z.B. Enzyme aus der Glykolyse mit Mangan- und Eisenkationen katalytisch aktiver sind als mit Mg^{2+} -Kationen [88]. Des Weiteren sind für den *Sporolactobacillus inulinus* weitere Sulfatsalze der Nebengruppenelemente der vierten Periode in verschiedenen Konzentrationen (im Bereich entsprechend des Magnesiumsulfats von 0,81 mM) getestet worden, um ihren Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien zu untersuchen.

3.4.8.2 Einfluss von Sulfatsalzen der ersten Übergangsmetalle auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus*

Zur Optimierung der Wachstumsgeschwindigkeit, anhand der vorigen Beobachtungen, wurden weitere Nebengruppenelemente der vierten Periode in drei unterschiedlichen Konzentrationen (0,5 mM, 1,0 mM und 2,0 mM) getestet. Neben den Mangan- und Eisens(II)-sulfatsalzen wurden ebenfalls die Sulfatsalze von Cobalt, Zink und Kupfer auf ihren Einfluss auf das bakterielle Wachstum untersucht.

Als Parameter für die Wachstumsgeschwindigkeit wurde die maximale Produktivität in g/(l·h) für die Ansätze berechnet. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der Abbildung 3.21 für den *Sporolactobacillus inulinus* dargestellt.

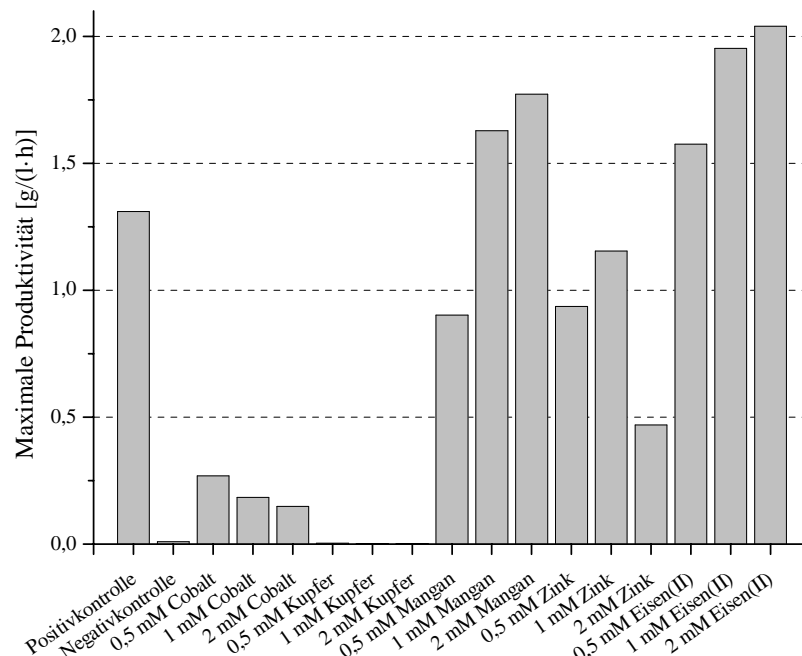


Abbildung 3.21: Variation von Sulfatsalzen der ersten Übergangsmetalle hinsichtlich des *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (2 ml Arbeitsvolumen) mit 80,0 g/l Glucose, 60,0 g/l CaCO_3 (gepulvert, Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 0 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 0,4. Positivkontrolle: GYP-Medium mit Magnesiumsulfat und Spurenelementen. Negativkontrolle: GYP-Medium ohne Salze und Spurenelemente. Das GYP-Medium enthält bei den weiteren Ansätzen nur das Sulfatsalz des entsprechenden Elements in der angegebenen Konzentration (siehe Beschriftung).

Die Abbildung zeigt, dass die Positivkontrolle (entspricht hinsichtlich der Medienzusammensetzung dem Kontrollansatz aus Abbildung 3.20) eine maximale Produktivität von 1,31 g/(l·h) erzielt, wohingegen die Negativkontrolle (ohne Salzkomponenten und Spurenelemente im Medium) erwartungsgemäß kein Wachstum aufweist. Die Experimente mit Cobaltsulfat zeigen ebenfalls nur ein geringes Wachstum auf, wobei hier konzentrationsabhängig, Werte von 0,28 g/(l·h) (0,5 mM), 0,18 g/(l·h) (1,0 mM) und 0,15 g/(l·h) bei 2,0 mM Cobaltsulfat im Medium erreicht werden. Ferner kann auch bei den Ansätzen mit Zinksulfat zuerst eine Steigerung der Produktivität von 0,93 g/(l·h) (0,5 mM) auf 1,15 g/(l·h) bei 1,0 mM beobachtet werden. Jedoch fällt der Wert bei 2,0 mM Zinksulfat wieder auf 0,47 g/(l·h) ab. Darüber hinaus ist bei den Ansätzen hinsichtlich des Kupfersulfats ebenfalls keine Produktivität zu erkennen. Bei den Ansätzen mit dem Mangansulfat ist eine konzentrationsabhängige Steigerung der maximalen Produktivität zu beobachten. So wird ein Produktivitätswert von 0,90 g/(l·h) (0,5 mM), 1,63 g/(l·h) (1,0 mM) und einem Maximalwert von 1,77 g/(l·h) mit 2,0 mM eingesetzten Mangansulfat erreicht.

Die größten Werte bezüglich der maximalen Produktivität der Bakterien können bei den Experimenten mit dem eingesetzten Eisen(II)-sulfat beobachtet werden. Mit 0,5 mM Eisen(II)-sulfat konnte ein Wert von 1,58 g/(l·h) erreicht werden, bei 1,0 mM Eisen(II)-Sulfat steigert sich die Produktivität auf 1,95 g/(L·h). Zusätzlich kann eine geringe Steigerung auf 2,04 g/(l·h) mit 2,0 mM Eisen(II)-sulfat erreicht werden (Liniendiagramm siehe Abbildung 5.12, Seite 122). Des Weiteren konnte die maximale Produktivität der Bakterien bezüglich der Kontrolle mit 2,0 mM Eisen(II)-sulfat um 0,71 g/(l·h) gesteigert werden. Ein weiterer Vorteil für eine industrielle Anwendung ist, dass auf Salzkomponenten, wie Mangan verzichtet werden kann, da sie mit dem günstigeren Eisen(II)-salz ersetzt werden können.

Darüber hinaus können die biophysikalischen Hintergründe für diese Ergebnisse sehr unterschiedlicher Natur sein und aufgrund ihrer Vielseitigkeit und Komplexität, soll hier nur kurz dazu Stellung bezogen werden.

- Zheng *et al.* (2014) konnte aufzeigen, dass die Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40) des *Sporolactobacillus inulinus* Y2-8 (*Sporolactobacillus inulinus* CASD, Genlocus: VBISpoInu206943_1117) mit Manganionen als Cofaktor die höchste Aktivität aufwies [88].
- Möglicherweise fungieren die Eisen- und Mangan-Ionen als effizientere Co-Faktoren für wichtige Enzyme des Metabolismus als z.B. die Magnesium-, Cobalt-, Kupfer- und Zink-Ionen. So können sich die Bakterien möglicherweise mit einer Mangan-abhängigen Superoxide Dismutase EC 1.15.1.1 (*Sporolactobacillus inulinus* CASD, Genlocus: VBISpoInu206943_1775) besser gegen oxidativen Stress durch reaktive Sauerstoffspezies schützen, indem sie z.B. Superoxid-Anionen (O_2^-) zu Wasserstoffperoxid und molekularen Sauerstoff umsetzen [89]
- Ferner findet sich auch ein weiteres Gen für ein DNA bindendes, allgemeines Stress-Protein (Genlocus: VBISpoInu206943_0746), welches ebenfalls Eisen für seine Aktivität benötigt und die Bakterien mit Hilfe dieses Proteins möglicherweise resistenter gegenüber zellulären Stress (pH-Stress, Hitze-Stress und DNA-Degeneration durch UV-Strahlung) sind [90].
- Vergleicht man des Weiteren die Ergebnisse zwischen Eisen(II)-Sulfat und den Ansätzen mit Mangansulfat für die jeweils eingesetzten Stoffmengenkonzentrationen, so stellt man fest, dass die Experimente mit Eisen(II)-sulfat höhere Werte hinsichtlich der maximalen Produktivität aufweisen. Diese Tatsache könnte damit erklärt werden, dass die Eisen(II)-Spezies bei Redoxreaktionen, im Zusammenhang mit den Eisen-Schwefel-Cluster-haltigen Proteinen, wie z.B. Ferredoxin und Flavodoxin und den Reduktionsäquivalenten NAD(P)H/ NAD(P)⁺ steht. Diese Proteine sind auf genomebene beim *Sporolactobacillus inulinus* CASD (Genloci: Ferredoxin VBISpoInu206943_2602 und Flavodoxin VBISpoInu206943_2830) zu finden [91]. Die Reduktionsäquivalente wiederum dienen unter anderem der D-Lactat-Dehydrogenase als Co-Faktor, wodurch das Eisen eine vielseitige Bedeutung für den Stoffwechsel der Bakterien hat [92].

3.4.8.3 Einfluss von Spurenelemente und Magnesiumsulfat auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus putidus*

Die Experimente zur Untersuchung der Einflüsse der Spurenelemente und des Magnesiumsulfats wurden analog zu den Ansätzen hinsichtlich des *Sporolactobacillus inulinus* prozessiert. Der Kontroll-Ansatz enthielt ebenfalls alle Salzkomponenten, wobei bei den weiteren Ansätzen entweder auf das Magnesiumsulfat oder auf die Spurenelemente verzichtet worden ist. Als Parameter wurden die Gesamtproduktivität [g/(l·h)] nach 93 h bzw. 161 h und die Lag-Phase der Bakterien anhand der D-Lactatkonzentration [g/l] (nach 41 Stunden) gewählt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der Abbildung 3.22 skizziert.

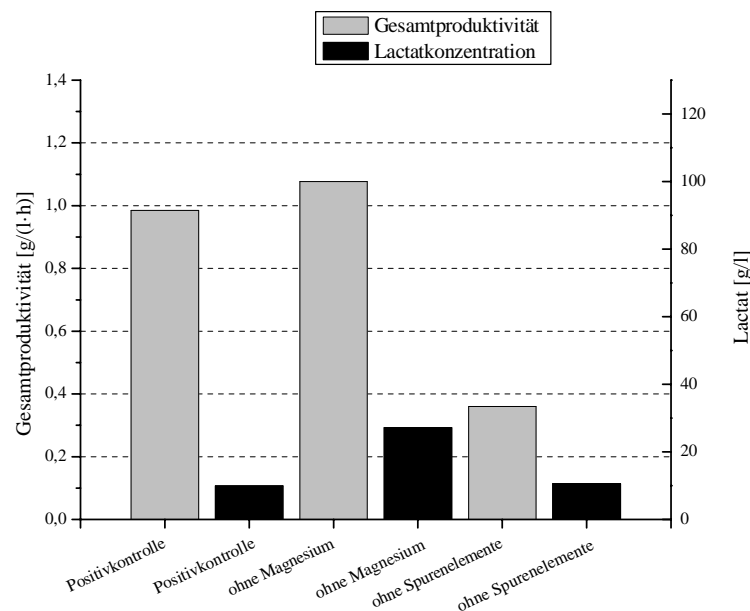


Abbildung 3.22: Einfluss der Salze und Spurenelemente hinsichtlich des *Sporolactobacillus putidus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 130,0 g/l Glucose, 60,0 g/l CaCO_3 (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 0,4.

Aus der Abbildung kann entnommen werden, dass sich die Produktivitätswerte mit 1,08 g/(l·h) für den Ansatz ohne Magnesiumsulfat und dem Kontrollwert mit 0,98 g/(l·h) nur geringfügig unterscheiden. Hingegen erreicht der Ansatz ohne die Spurenelemente im Vergleich nur einen Wert von 0,36 g/(l·h), was auch für diese Untersuchung den Schluss zulässt, dass die Mangan- und Eisensalze für das bakterielle Wachstum essentiell sind. Vergleicht man des Weiteren die Lag-Phase der Bakterien, so stellt man einen deutlichen Unterschied zwischen der Kontrolle und dem Ansatz ohne Magnesiumsulfat fest. Während das Kontrollexperiment eine D-Lactatkonzentration von 9,9 g/l nach 41 Stunden erreicht, so wird zum selben Zeitpunkt im Ansatz ohne Magnesiumsulfat eine Produktkonzentration von 27,1 g/l gemessen. Hingegen erreicht der Ansatz ohne die Spurenelemente mit 10,6 g/l D-Lactat einen ähnlichen Wert wie die Kontrolle. Im Vergleich zu den Ergebnissen bezüglich des *Sporolactobacillus inulinus*,

wo das Magnesiumsulfat nur einen geringen Einfluss auf die Produktivität hat, wird hier deutlich, dass sich das Magnesiumsulfat in Kombination mit den anderen Spurenelementsalzen (Kontrolle) negativ auf das initiale Wachstum und die D-Lactatproduktion der der Bakterien auswirkt. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung könnte sein, dass Mg^{2+} und Mn^{2+} bzw. Fe^{2+} um die Bindungsstellen in Enzymen konkurrieren, wobei alle drei Kationenspezies gleichwertig an die Enzyme binden können. Für den Kontrollansatz wären dann Mn^{2+} (0,05 mM) und Fe^{2+} (0,04 mM) im molaren Verhältnis zum Mg^{2+} (0,81 mM) stark unterrepräsentiert und die Enzymbindungsplätze wären präferentiell von den Mg^{2+} -Kationen besetzt. Sollte die Enzymaktivität mit den Co-Faktoren Mn^{2+} und/ oder Fe^{2+} jedoch höher sein als mit Mg^{2+} , wie von Zheng *et al.* (2014) für die Pyruvatkinase des *Sporolactobacillus inulinus* Y2-8 publiziert, so wäre die katalytische Aktivität dieser Enzyme ohne um die Bindungsplätze konkurrierendes Mg^{2+} im Medium höher und könnte zu dem Ergebnis in der Abbildung 3.22 (ohne Magnesium) führen [88].

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse zeigen, dass das Magnesiumsulfat im Medium nur einen geringen Einfluss auf die Gesamtproduktivität des *Sporolactobacillus inulinus* hat. Zusätzlich kann eine Erhöhung der Mangan- oder Eisenkonzentration die maximale Produktivität der Bakterien steigern. Im Gegensatz zum *Sporolactobacillus inulinus*, scheint sich die Anwesenheit des Magnesiumsulfats im Medium negativ auf das Wachstum und der Produktivität des *Sporolactobacillus putidus* auszuwirken. Da diese Ergebnisse zum Ende der experimentellen Phase dieser Arbeit gewonnen wurden, ist aus Zeitgründen auf weitere Untersuchungen für den *Sporolactobacillus putidus* verzichtet worden.

3.5 Untersuchung zur Nutzbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen bezüglich der *Sporolactobacillus* Spezies

Das Ziel dieser Untersuchungen war es festzustellen, welche Kohlenstoffquellen von den Bakterien genutzt werden können, um alternative Ressourcen auf der Basis agrarischer Reststoffe entsprechend der Nutzbarkeit der enthaltenden Zucker auswählen zu können. Die Resultate der Experimente sind in der Tabelle 3.9 dargestellt. Zur Bestimmung der Nutzbarkeit der Kohlenstoffquellen wurden die *Sporolactobacillus* Spezies im 96-Well-Maßstab in einem Mikrotiterplattenleser (Glycerin, siehe Kapitel 2.4.1, Seite 26) mit den entsprechenden C-Quellen (jeweils 20,0 g/l) für 72 h inkubiert (Die entsprechenden Ergebnisse der D-Lactat-Messungen mittels HPLC befinden sich im Anhang 5.12 und 5.13, Seiten 123 - 124). Als Positivkontrolle dienten hierbei Ansätze mit D-Glucose als Kohlenstoffquelle und als Negativkontrolle wurden Ansätze ohne Kohlenstoffquelle prozessiert. Diejenigen Experimente, welche eine äquivalente D-Lactatproduktion in Referenz mit der Positivkontrolle zeigten, wurden mit + bewertet. Ergebnisse die eine geringere D-Lactatproduktion aufwiesen wurden mit (+) gekennzeichnet. Die Experimente, welche in den Ergebnissen der Negativkontrolle entsprachen, wurden mit – markiert.

Tabelle 3.9: Substratverwertbarkeit für die *Sporolactobacillus* Spezies nach Kohlenstoffquelle und Spezifikation.

Spezifikation/ Anzahl der Kohlenstoffatome	Kohlenstoffquelle	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	<i>Sporolactobacillus putidus</i>
Triol/ C-3	Glycerin	-	-
Aldose/ C-5	L-Arabinose	-	-
Aldose/ C-5	D-Arabinose	-	-
Aldose/ C-5	D-Xylose	-	-
Aldose/ C-5	D-Ribose	-	-
Aldose/ C-6	D-Glucose	+	+
Ketose/ C-6	D-Fructose	+	+
Aldose/ C-6	D-Galactose	-	+
Uronsäure/ C-6	D-Galacturonsäure	-	-
Aldose/ C-6	D-Mannose	+	+
Aldose/ C-6	L-Rhamnose	-	-
Ketose/ C-6	L-Sorbose	-	-
Aldose/ C-6	D-Glucosamin	-	-
Disaccharid/ C-12	Lactose	-	-
Disaccharid/ C-12	Saccharose	+	+
Disaccharid/ C-12	Isomaltulose	+	-
Disaccharid/ C-12	Trehalulose	+	-
Disaccharid/ C-12	Maltose	+	+
Trisaccharid/ C-18	D-Raffinose	(+)	-
Polysaccharid/ M _w =10000	Pullulan	-	-

+: äquivalente D-Lactatproduktion zur Glucosekontrolle. (+): geringe D-Lactatproduktion. -: keine D-Lactatproduktion.

Anhand der Tabelle wird deutlich, dass der *Sporolactobacillus inulinus* kein Glycerin und keine Pentosen, wie Arabinose, Xylose und Ribose für die Produktion von D-Lactat nutzen kann. Ferner kann D-Lactat aus Monosacchariden, wie den Hexosen, Glucose, Fructose und Mannose, aber nicht aus Galactose, Rhamnose, Sorbose, Glucosamin und Galacturonsäure gewonnen werden. Darüber hinaus können die Bakterien auch Disaccharide, wie Saccharose, Isomaltulose, Trehalulose und Maltose, aber nicht Lactose zu D-Lactat metabolisieren. Interessanterweise kann auch das Trisaccharid Raffinose genutzt werden, aber nicht das Polysaccharid Pullulan.

Ein Vergleich mit den Literaturdaten von Kitahara und Suzuki *et al.* (1963) zeigt konsistente Ergebnisse bezüglich der Nutzbarkeit der verschiedenen Zuckerspezies. [84] Die Daten zeigen, dass weder Glycerin, noch Pentosen zur Kultivierung der Bakterien genutzt werden können. Ebenfalls stimmen die Ergebnisse hinsichtlich der verstoffwechselbaren Hexosen und der höherkettigen Zucker überein.

Hinsichtlich des *Sporolactobacillus putidus* kann der Tabelle 3.9 entnommen werden, dass Glycerin und Pentosen nicht von den Bakterien als C-Quelle genutzt werden können. Des Weiteren können die Bakterien aus den Hexosen Glucose, Fructose, Galactose und Mannose D-Lactat produzieren, nicht aber

aus Rhamnose, Sorbose, Glucosamin und Galacturonsäure. Ebenfalls genutzt werden können die Disaccharide Saccharose und Maltose. Isomaltulose, Trehalulose und Lactose können wiederum nicht metabolisiert werden. Ferner zeigen die Bakterien bei den längerkettigen Zucker, wie Raffinose und Pullulan kein Wachstum bzw. keine D-Lactatproduktion. Ein Vergleich mit den verfügbaren Literaturwerten von Fujita *et al.* (2010) zeigt eine Übereinstimmung der Ergebnisse bezüglich der getesteten Zucker. [85]

Die Tatsache das Glycerin als Kohlenstoffquelle für die *Sporolactobacillus* Spezies nicht genutzt werden kann, kann möglicherweise mit dem auf die Bakterien wirksamen osmotischen Stress erklärt werden. Glycerin besitzt eine molare Masse von 92,1 g/mol, welche ungefähr die Hälfte der molaren Masse von Glucose (180,2 g/mol) entspricht. Demzufolge ist der osmotische Stress auf die Bakterien bei äquivalenter Konzentration zur Glucose ca. doppelt so hoch. Darüber hinaus ist es möglich, dass das regulatorische System zur Aufnahme von Glycerin bei höheren Konzentrationen ineffizient funktioniert und somit Glycerin angesichts der geringen Molekülgröße ungehindert die Biomembran passieren kann.

Des Weiteren kann die Nichtnutzbarkeit der Pentosen mit dem Umstand erklärt werden, dass die beiden *Sporolactobacillus* Spezies homofermentativ sind und somit das Enzym Tagatose 1,6-Diphosphate-Aldolase (EC 4.1.2.40, Genlokus: VBISpoInu206943_2259) nicht in der Lage ist C-5-Zucker katalytisch zu spalten. Die Unterschiede bezüglich der Nutzbarkeit der Hexosen kann darüber hinaus möglicherweise mit der Substratspezifität der Hexokinase der Bakterien erklärt werden, welche nur bestimmte Hexosen als Substrat erkennt und diese phosphoryliert. So kann erklärt werden, dass der *Sporolactobacillus putidus* zum Beispiel Galactose metabolisiert, welche der *Sporolactobacillus inulinus* nicht stoffwechselspezifisch zu D-Lactat konvertieren kann. Zudem konnte Zheng *et al.* (2012) bei der Charakterisierung der Hexokinase bezüglich des *Sporolactobacillus inulinus* Y2-8 feststellen, dass diese neben der Substrat-Variabilität hinsichtlich Hexosen, auch in der Lage war das Disaccharid Maltose zu phosphorylieren [88].

Darüber hinaus ist die Nutzbarkeit der Disaccharide möglicherweise auf die Anwesenheit von Glycosidasen zurückzuführen. So können beide Spezies keine Lactose metabolisieren, was auf das Fehlen einer β -Galactosidase hinweist. Andererseits metabolisieren beide Spezies Saccharose und Maltose, was darauf hindeutet, dass die Bakterien über eine α -1,2-Glucosidase (EC 3.2.1.122, Genlocus: VBISpoInu206943_1514) bzw. über eine α -1,4-Glucosidase (EC 3.2.1.20, Genlocus: VBISpoInu206943_2561) verfügen. Der *Sporolactobacillus inulinus* kann darüber hinaus Isomaltulose und Trehalulose nutzen, welche sich nur aufgrund der glycosidischen Bindung zwischen Glucose und Fructose gegenüber der Saccharose unterscheiden. So können die Bakterien im Fall der Isomaltulose zusätzlich eine α -1,6-Glucosidase (EC 3.2.1.10, Genloci: VBISpoInu206943_2753/ VBISpoInu206943_2847/ VBISpoInu206943_1473) exprimieren bzw. ein Enzym mit α -1,1-Glucosidase-Funktion bezüglich der Trehalulose.

3.6 Untersuchung von alternativen Kohlenstoffquellen zur D-Lactatproduktion hinsichtlich der *Sporolactobacillus* Spezies

Diese Experimente sollten die Nutzbarkeit von alternativen Kohlenstoffquellen (C-Quellen) auf der Basis von Agrarreststoffen zur Produktion von D-Lactat testen. Die Auswahl der Substrate basierte auf den Ergebnissen der Untersuchung verschiedener Kohlenstoffquellen (siehe Kapitel 3.5, Seite 73 folgende). So konnte gezeigt werden, dass die Bakterien in der Lage sind Disaccharide, wie z.B. Saccharose zu D-Lactat umzusetzen. Diese Tatsache macht Melassen und Zuckerrübenschnitzsaft (ZRDS) als Nebenprodukte der Zuckerherstellung zu potentiellen alternativen Kohlenstoffquellen, die zudem keiner hydrolytischen Vorbehandlung bedürfen.

3.6.1 Untersuchung von alternativen Kohlenstoffquellen zur D-Lactatproduktion hinsichtlich des *Sporolactobacillus inulinus*

Zur Untersuchung von alternativen C-Quellen zur Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus* wurden 6 Melassen auf Saccharose-Basis getestet. Darunter eine Melasse aus Indien (Sacch. Melasse) und 5 Melassen von der Südzucker AG (Mel. 1–5 Sacch.). Darüber hinaus wurde eine weitere Melasse auf Palatinose- und Isomaltulose-Basis und Zuckerrübenschnitzsaft untersucht. Als Kontrollen dienten Ansätze mit Glucose (Positivkontrolle) und Saccharose als C-Quelle. Des Weiteren wurde die Gesamtproduktivität in g/(l·h) nach 96 Stunden (bzw. 72 Stunden bei der Saccharose-Kontrolle, da zu diesem Zeitpunkt das Substrat vollständig umgesetzt wurde) Kultivierungsdauer als Vergleichskriterium hinsichtlich der Experimente gewählt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.23 für den *Sporolactobacillus inulinus* anhand der Gesamtproduktivität gegen die eingesetzte alternative Kohlenstoffquelle aufgetragen.

Die Abbildung 3.23 veranschaulicht, dass die Bakterien die Melassen 1 – 5 sowie die indische Saccharose-Melasse nicht zur D-Lactatproduktion verwenden können. Darüber hinaus erreichen die Bakterien auf der Palatinose-Melasse eine Produktivität von 0,65 g/(l·h) und 0,94 g/(l·h), wenn ZRDS als alternative C-Quelle eingesetzt wird. Dieser Wert entspricht in etwa der Produktivität der Positivkontrolle (Glucose) mit 1,04 g/(l·h). Hingegen wird der höchste Produktivitätswert von 1,42 g/(l·h) mit dem Saccharose-Kontrollansatz erzielt. Eine mögliche Ursache für die Nichtnutzbarkeit der Melassen bezüglich des *Sporolactobacillus inulinus* könnte auf Inhibitoren zurückzuführen sein (Calabia und Tokiwa 2007), die sich suboptimal auf das Wachstum der Bakterien auswirken [67]. Takara *et al.* (2007) konnte diesbezüglich antibakterielle Eigenschaften von Phenolbestandteilen in Zuckerrohrmelassen nachweisen [94].

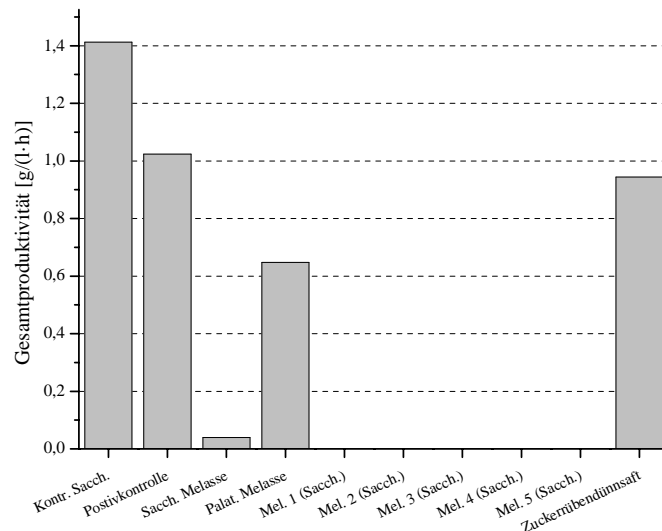


Abbildung 3.23: Untersuchungen von alternativen Kohlenstoffquellen zur D-Lactatproduktion für den *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 150,0 g/l C-Quelle, 60,0 g/l CaCO_3 (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 0,4.

Des Weiteren können zum einen die Pufferkapazität der Melassen (Dumbrepatil *et al.* 2008) und zum anderen auch die hohe Viskosität der Melassen (Hofvendahl und Hahn-Hägerdal 2000) einen Einfluss auf das bakterielle Wachstum haben [54, 95]. Hinsichtlich der hier gezeigten Ergebnisse könnte eine hohe Pufferkapazität der Melassen das anfängliche Wachstum der Bakterien negativ beeinflusst haben.

3.6.2 Untersuchung von alternativen Kohlenstoffquellen zur D-Lactatproduktion hinsichtlich des *Sporolactobacillus putidus*

Hinsichtlich des *Sporolactobacillus putidus* sind ebenfalls die zuvor beschriebenen alternativen C-Quellen getestet worden. Ferner wurde bei diesen Versuchen ebenfalls die Gesamtproduktivität in g/(l·h) nach 96 Stunden (bzw. 72 Stunden bei der Saccharose-Kontrolle, da zu diesem Zeitpunkt das Substrat vollständig umgesetzt wurde) als Vergleich gewählt.

Die Resultate der Experimente sind in der Abbildung 3.24 präsentiert. Sie zeigt, dass der *Sporolactobacillus putidus* nicht dazu in der Lage ist die indische Saccharose-Melasse, die Palatinose-Melasse und die Melassen 1–5 als C-Quelle zu nutzen. Lediglich der Test mit dem ZRDS erreicht eine Produktivität von 0,68 g/(l·h). Hingegen erreicht die Positivkontrolle einen Wert von 0,96 g/(l·h) und der Saccharose-Ansatz erzielt eine Produktivität von 1,41 g/(l·h).

Auch bei diesen Experimenten könnten Inhibitoren die Ursache für die Nichtnutzbarkeit der Melassen 1 -5, der Palatinose-Melasse und der indischen Melasse sein. Des Weiteren kann die Nichtnutzbarkeit der Palatinose-Melasse durch den *Sporolactobacillus putidus* damit begründet werden, dass die Bakterien die Isomaltulose und Trehalulose (repräsentieren 55,4 % von 89,7 % Gesamtzuckeranteil) nicht metabolisieren können (siehe Tabelle 3.9, Seite 74). Somit stehen den Bakterien theoretisch nur

ca. 35,0 % an nutzbaren Zuckern für die D-Lactatproduktion zur Verfügung. Im Gegensatz dazu stellt der Zuckerrübensaft eine Vorstufe der Melasse dar, wodurch die Konzentration möglicher inhibierender Substanzen geringer ist und dadurch das bakterielle Wachstum weniger stark negativ beeinträchtigt wird.

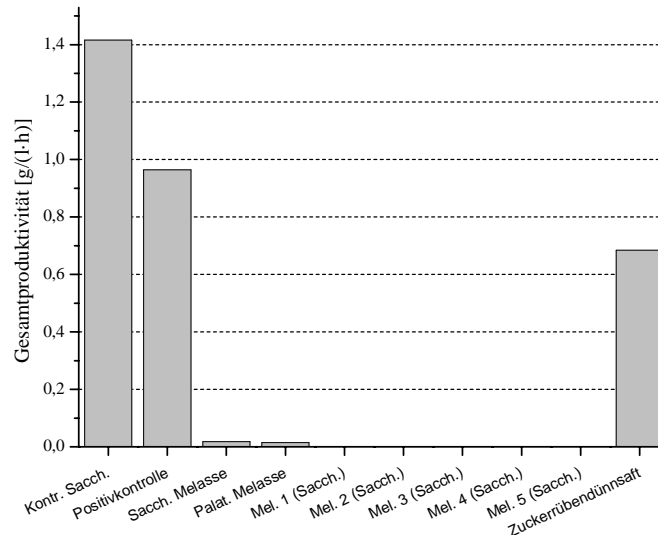


Abbildung 3.24: Untersuchungen von alternativen Kohlenstoffquellen zur D-Lactatproduktion für den *Sporolactobacillus putidus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 150,0 g/l C-Quelle, 60,0 g/l CaCO_3 (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 0,4.

Schlussfolgerung: Im Unterschied zu den Ergebnissen des *Sporolactobacillus putidus* kann die Palatinose-Melasse als alternative C-Quelle von dem *Sporolactobacillus inulinus* verwendet werden. Dies liegt einerseits an der Nutzbarkeit der Isomaltulose/ Trehalulose durch die Bakterien, andererseits an einer möglicherweise höheren Unempfindlichkeit gegenüber etwaigen Hemmstoffen. Des Weiteren wird die höchste Produktivität bei beiden Spezies durch die Saccharose-Kontrolle mit 1,42 g/(l·h) erreicht. Vergleicht man diesbezüglich die Produktivität des ZRDS-Ansatzes mit der Glucose-Kontrolle, so sind beide Werte für den *Sporolactobacillus inulinus* ungefähr gleich. Dagegen erzielt der *Sporolactobacillus putidus* mit ZRDS nur ca. 71,0 % der Produktivität der Positivkontrolle. Zieht man darüber hinaus die Saccharose-Kontrolle hinzu, so ist der Wert beim ZRDS-Ansatz um ca. 52,0 % geringer. Die Differenz für den *Sporolactobacillus inulinus* beträgt hingegen 34,0 %. Ein Vergleich der Kontrollansätze zwischen Glucose und Saccharose zeigt bei beiden Spezies eine ca. 30,0 % höhere Gesamtproduktivität hinsichtlich des Saccharose-Ansatzes (Abbildung 3.23 und Abbildung 3.24). Die höhere Metabolisierungsrate hinsichtlich der Saccharose kann möglicherweise damit erklärt werden, dass der osmotische Druck auf die Bakterien, bei gleicher Zuckerstartkonzentration (jeweils 150,0 g/l) nur ca. halb so groß ist als im Vergleich zur Glucose. Nichtsdestotrotz soll dieser Sachverhalt in einem konsekutiven Experiment bezüglich des *Sporolactobacillus inulinus* nachgeprüft werden (siehe Kapitel 3.6.3). Ein weiterer Vergleich mit der verfügbaren Literatur zeigt, dass neben Melassen und Zuckerrübensaft (Calabia und Tokiwa 2007), auch Stärkehydrolysate aus Mais und Reis (Zhao *et al.* 2014 und Nakano *et al.* 2012) durchaus als potentielle alternative C-Quellen genutzt werden können

[67, 70, 72]. Ein Nachteil dieser Ersatzstoffe ist die chemische oder enzymatische Vorbehandlung, die die Gesamtkosten erhöhen können, während die hier verwendeten Substrate keiner Vorbehandlung bedürfen.

3.6.3 Untersuchung zum Saccharose/ Glucose-Metabolismus hinsichtlich des *Sporolactobacillus inulinus*

Zur Untersuchung des Zuckermetabolismus hinsichtlich der Saccharose und Glucose des *Sporolactobacillus inulinus* sind vier verschiedene Ansätze gemacht worden. Der erste Ansatz war eine Positivkontrolle (1) mit 158,3 g/l Glucose, ein weiterer Ansatz (2) ist mit 93,1 g/l Glucose gestartet worden und im dritten Experiment (3) wurden 178,7 g/l Saccharose als Kohlenstoffquelle eingesetzt. Das vierte Experiment (4) bestand aus einem kompetitiven Ansatz mit 100,2 g/l Glucose und 89,2 g/l Saccharose. Als Vergleichsparameter wurden hier die maximale Produktivität [g/l·h] und die D-Lactatkonzentration [g/l] nach 48 Stunden (als Maß für die Lag-Phase der Bakterien) gewählt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der Abbildung 3.25 aufgezeigt.

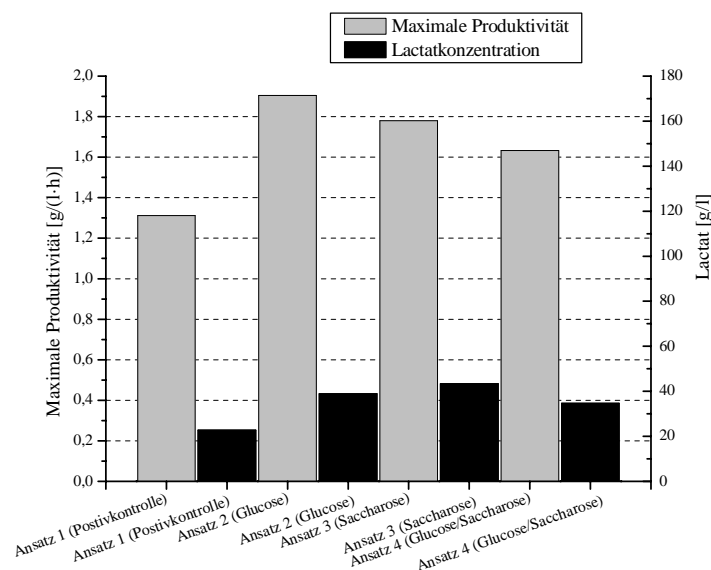


Abbildung 3.25: Untersuchungen von verschiedenen Glucose- und Saccharosekonzentrationen für den *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 60,0 g/l CaCO_3 (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 0,4.

Sollte zudem die erhöhte Produktivität der Bakterien bezüglich der Saccharose auf den osmotischen Druck zurückzuführen sein, so sollten die Werte hinsichtlich der maximalen Produktivität und der D-Lactatkonzentration nach 48 Stunden bei den Ansätzen (2) und (3), mit 93,1 g/l Glucose (0,52 M) und 178,7 g/l Saccharose (0,55 M), ungefähr gleich sein. Aus der Abbildung wird deutlich, dass der Kontrollansatz (1) einen Produktivitätswert von 1,31 g/(l·h) aufzeigt. Der Ansatz mit 93,1 g/l Glucose

(2) erzielt einen Wert von 1,91 g/(l·h) und die Ansätze (3) und (4) erreichen P_{\max} -Werte von 1,78 und 1,63 g/(l·h).

Vergleicht man darüber hinaus die D-Lactatkonzentrationen der Experimente nach 48 Stunden, so ist bei der Kontrolle (1) ein Wert von 22,7 g/l gemessen worden. Die Ansätze (2) und (3) erreichen im Vergleich Werte von 39,0 und 43,4 g/l D-Lactat, während die HPLC-Messung für den Ansatz mit 100,2 g/l Glucose und 89,2 g/l Saccharose (4) eine Produktkonzentration von 34,7 g/l ergeben hat.

Ferner unterscheiden sich die Ansätze (2) und (3) kaum hinsichtlich der Produktivitätswerte. Die Differenz beträgt nur 0,13 g/(l·h), was einer Abweichung von 6,8 % entspricht. Ebenfalls gering ist der Unterschied der Werte bezüglich der D-Lactatkonzentration nach 48 Stunden (4,4 g/l). Das lässt darauf schließen, dass der osmotische Druck dafür verantwortlich ist, dass die maximale Produktionsgeschwindigkeit bei einer Saccharose-Konzentration von 178,7 g/l höher ist (35,8 %) als bei einer Glucosestartkonzentration von 158,3 g/l (Ansätze 1 und 3). Um weitere Informationen hinsichtlich des Zuckermetabolismus der Bakterien zu bekommen, wurde der Verbrauch der Kohlenstoffquellen substratspezifisch für den Ansatz (4) untersucht.

Die Zuckerkonzentrationen [g/l] sind für den Ansatz (4) zu den jeweiligen Probenahmezeitpunkten in der Abbildung 3.26 dargestellt. In der Abbildung ist zu erkennen, dass die Bakterien präferentiell die Saccharose metabolisieren bevor die Glucose sukzessive abgebaut wird.

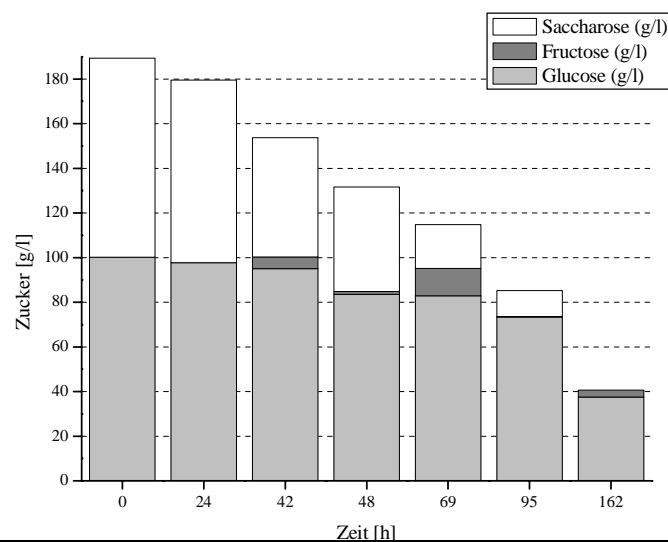


Abbildung 3.26: Untersuchungen von verschiedenen Glucose- und Saccharosekonzentrationen für den *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 60,0 g/l CaCO_3 (Neutralisationsmittel) bei 38 °C und 120 RPM. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 0,4.

So sind nach 95 h 87,0 % der Saccharose (77,6 g/l) abgebaut, während die Glucose zu diesem Zeitpunkt nur zu 27,0 % (26,8 g/l) von den Zellen metabolisiert worden ist (die D-Lactatkonzentration beträgt zu diesem Zeitpunkt 101,0 g/l). Darüber hinaus kann davon ausgegangen werden, dass die Saccharose intrazellulär von den Bakterien abgebaut wird, da während der Kultivierung, die Konzentrationen der

Monomere Glucose und Fructose im Medium nicht in dem Maße zunehmen, wie die Konzentration der Saccharose abnimmt.

Diese Ergebnisse sind angesichts der Tatsache interessant, dass man erwartungsgemäß davon ausgeht, dass die Monosaccharide aufgrund der Katabolitenrepression durch das Saccharose-Operon-Repressor-Gen (ScR-Gen) bevorzugt von den Bakterien abgebaut werden, bevor eine andere Kohlenstoffquelle, wie hier Saccharose, metabolisiert wird. Umfangreiche Übersichtsartikel zu dem Thema Katabolitenrepression sind von Deutscher *et al.* (2008) und Fujita *et al.* (2009) verfasst worden [96, 97]. Ein Vergleich der Ergebnisse mit Literaturdaten von Teixeira *et al.* (2013) bezüglich des *Lactobacillus reuteri* zeigt, dass dieses Gen möglicherweise bei dem *Sporolactobacillus inulinus* (Genlokus: VBISpoInu206943_0041) ebenfalls ausgeschaltet ist und somit die Saccharose die bevorzugte Kohlenstoffquelle für die Bakterien ist. Die Verfasser dieser Studie haben diesen Sachverhalt damit begründet, dass die Inaktivierung des ScR-Gens zur Adaption des bakteriellen Zuckermetabolismus an eine pflanzliche Umgebung geführt hat, wo Saccharose und Raffinose die häufigsten Kohlenstoffquellen sind [98].

3.7 Reaktionsparameteroptimierung im Bioreaktor und Erlenmeyerkolben zur Kultivierung der *Sporolactobacillus* Spezies

Mit Hilfe der Optimierung der Reaktionsparameter im Bioreaktor und Erlenmeyerkolben werden im Folgendem wichtige Parameter, wie die Kultivierungsbedingungen unter Schutzgasatmosphäre, der Einfluss des pH-Werts, die Einflüsse von verschiedenen Inokula auf die Hauptkultur sowie die optimale Reaktionsführung für die D-Lactatproduktion erörtert.

3.7.1 Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus* im Bioreaktor unter mikroaeroben/ anaeroben Bedingungen

Diese Experimente sollten den Einfluss von mikroaeroben/ anaeroben Bedingungen hinsichtlich der Kultivierung der Bakterien untersuchen, da die Gattung als mikroaerophil bzw. fakultativ anaerob eingestuft wird und es zu diesem Zeitpunkt keine eindeutigen, publizierten Untersuchungen hinsichtlich der Kultivierungsbedingungen unter Schutzatmosphäre gab. Lediglich Doores und Westhoff (1983), die ein Protokoll zur Isolation von *Sporolactobacillen* aus Nahrung und Umwelt entwickelt haben, geben an, dass eine fünfprozentige Kohlenstoffdioxid-Atmosphäre (CO₂) zur Kultivierung der Bakterien förderlich sei [99].

3.7.1.1 Einfluss von Kohlenstoffdioxid (CO₂) hinsichtlich der Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus*

Um den Einfluss von CO₂ auf das bakterielle Wachstum zu untersuchen, wurden vier Experimente mit Begasungsraten von 0,1 slph (0,016 vvm) durchgeführt.

- Als Referenz wurde der erste Ansatz unter N₂-Atmosphäre und mit 3,0 molarer NaOH als Neutralisationsmittel prozessiert.
- Der zweite Ansatz wurde mit CO₂-Gas und ebenfalls mit 3,0 molarer NaOH durchgeführt.
- Hingegen wurde der dritte Ansatz unter N₂-Atmosphäre und mit einer gesättigten KHCO₃-Lösung als Neutralisationsmittel realisiert.
- Das vierte Experiment wurde wieder unter CO₂-Atmosphäre und ebenfalls mit KHCO₃ als Neutralisationsmittel durchgeführt.

Sollte CO₂ das Wachstum der Bakterien beeinflussen, so sollte ein Unterschied zwischen der Referenz (N₂ und NaOH) und den weiteren Ansätzen zu erkennen sein. Für die Spezifizierung des pH-Sollwertes während der Kultivierung wurden die Daten der Abbildung 3.10 (Seite 51) hinzugezogen. Dabei wurde der Mittelwert (Ansätze V1, pH 4,8) über die Gesamtprozesszeit als Referenz genommen. Somit wurden die Experimente mit einem pH-Sollwert von 4,8 prozessiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind anhand der Gesamtproduktivität und der Ausbeute nach 135 h Kultivierungsdauer in der Abbildung 3.27 dargestellt.

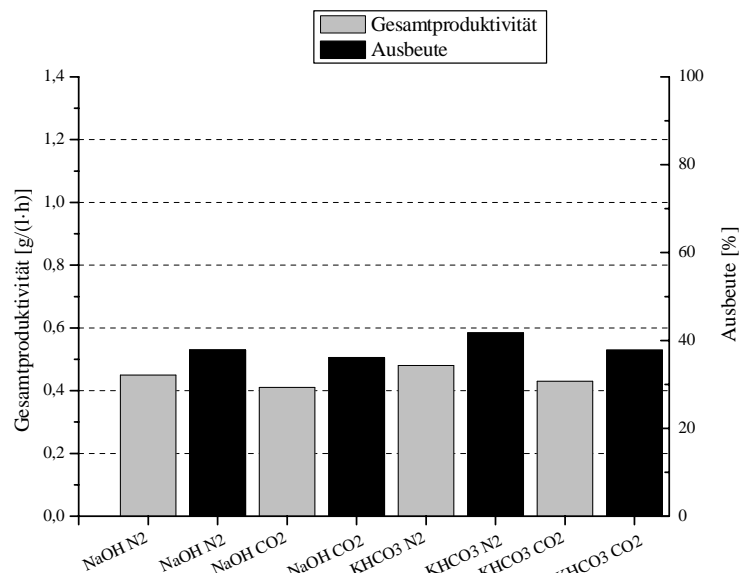


Abbildung 3.27: Einfluss von Kohlenstoffdioxid auf den *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 150,0 g/l Glucose bei 38 °C. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD₆₀₅ von 0,4. Begasungsrate 0,1 slph (N₂ oder CO₂) und 100 RPM Rührgeschwindigkeit. Der Start-pH-Wert wurde auf 6,2 eingestellt und ist entweder mit einer gesättigten KHCO₃-Lösung oder mit 3,0 M NaOH (pH 4,8) aufrechterhalten worden.

Die Ergebnisse in der Abbildung zeigen keine signifikanten Unterschiede bei der Produktivität der Bakterien. So erreicht der Ansatz mit NaOH als Neutralisationsmittel unter N₂-Atmosphäre einen

Produktivitätswert von 0,45 g/(l·h). Ferner erzielt der Ansatz mit KHCO_3 unter CO_2 -Atmosphäre einen ähnlichen Wert von 0,43 g/(l·h). Im Vergleich weisen die Ansätze mit NaOH unter CO_2 -Atmosphäre und mit KHCO_3 unter N_2 -Atmosphäre eine Produktivität von 0,41 bzw. 0,48 g/(l·h) auf. Zusätzlich werden die Ergebnisse durch die Ausbeutewerte bestätigt, welche bei allen Ansätzen bei knapp 40,0 % liegen. Des Weiteren zeigt eine Erhebung der maximalen Produktivität ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede. So kann ein durchschnittlicher P_{\max} -Wert von 1,00 g/(l·h) für die Ansätze errechnet werden. Anhand dieser Ergebnisse kann ausgeschlossen werden, dass das atmosphärische Kohlenstoffdioxid sowie das durch das Carbonat (KHCO_3) freiwerdende CO_2 einen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien haben.

3.7.1.2 Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus* unter Stickstoff-Atmosphäre und mikroaeroben Bedingungen

Die Experimente zur Untersuchung der Wachstumsbedingungen unter Schutzgasatmosphäre bzw. mikroaeroben Bedingungen wurden mit einer Ammoniaklösung (3,4 molare NH_3 -Lösung) als Neutralisationsmittel bei einem konstanten pH-Sollwert von 4,8 durchgeführt. Die Ansätze unter Schutzgasatmosphäre wurden mit Stickstoff (N_2), mit einer Rate von 0,25 slph (0,04 vvm) begast. Hingegen wurde bei der mikroaeroben Kultivierung auf eine Regelung der atmosphärischen Bedingungen verzichtet. Nach 96 h (mikroaerob) bzw. 135 h (mit N_2) Kultivierungsdauer wurden die Ergebnisse anhand der Gesamtproduktivität in g/(l·h) und der Ausbeute in % verglichen. In der Abbildung 3.28 (links) sind Resultate für den *Sporolactobacillus inulinus* dargestellt.

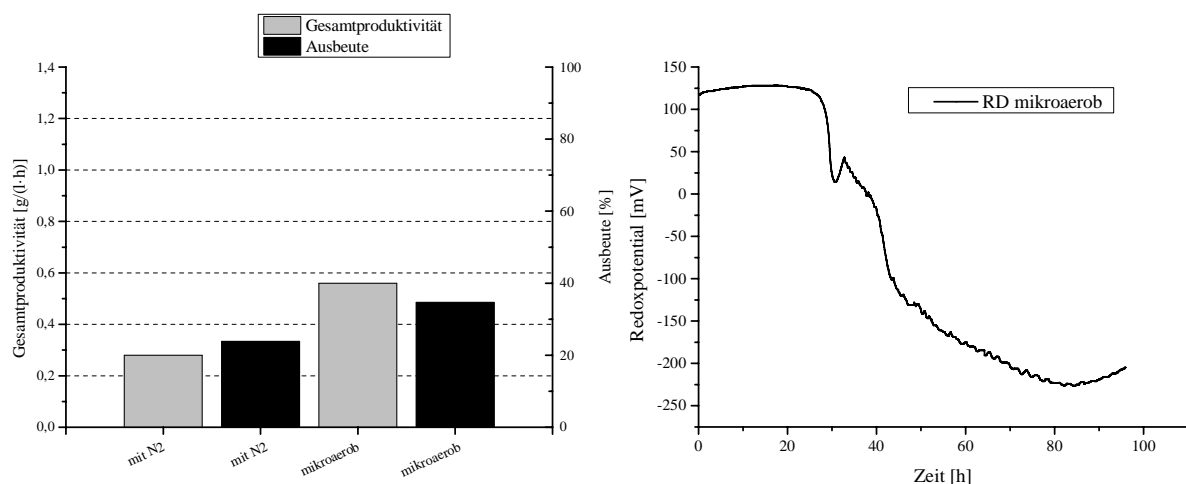


Abbildung 3.28: Links: Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus* mit N_2 -Schutzgas und mikroaerob im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 150,0 g/l Glucose bei 38 °C. 4,0 % Inokulum (OD_{605} von 0,4 der Vorkultur). Begasungsrate 0,25 slph (N_2) und 100 RPM Rührgeschwindigkeit. Start-pH-Wert 6,2 und pH-Sollwert 4,8. Neutralisationsmittel: 3,4 M $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. **Rechts:** Zeitliche Auflösung des Redoxpotentials des mikroaeroben Ansatzes.

Aus der Abbildung (links) geht hervor, dass die Gesamtproduktivität bei den Versuchen unter Schutzgasatmosphäre mit 0,28 g/(l·h) einen niedrigeren Wert erreichen als die Kultivierung ohne Schutzgasatmosphäre, welche einen Wert von 0,56 g/(l·h) nach Ende des Experiments erzielt. Ebenfalls ist die Ausbeute bei mikroaeroben Kultivierungsbedingungen (35,0 %) gegenüber dem Experiment unter N₂-Atmosphäre (24,0 %) leicht erhöht. Aus dem rechten Abbildungsteil geht hervor, dass Sauerstoff keinen Einfluss auf die eigentliche D-Lactat-Biosynthese hat, da das Redoxpotential (im Minimum) ungefähr dem Wert für das Pyruvat-Lactat-Redoxpaar (-190 mV) entspricht [100].

Schlussfolgerung: Aus den Ergebnissen der Experimente, unter Berücksichtigung der Kultivierungsbedingungen mit und ohne Schutzgasatmosphäre, kann geschlossen werden, dass die Bakterien eine mikroaerobe Umgebung gegenüber einem sauerstofffreien Milieu bevorzugen. So wiesen die Experimente unter Schutzgasatmosphäre, unter Berücksichtigung der Begasungsrate, Produktivitätswerte von 0,28 g/(l·h) bei 0,25 slph bzw. durchschnittlich 0,41 g/(l·h) mit 0,1 slph auf. Im Vergleich dazu erreichten die Bakterien unter mikroaeroben Bedingungen eine Gesamtproduktivität von 0,56 g/(l·h). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei weiteren Kultivierung im Reaktorsystem auf den Einsatz von Schutzgas verzichtet. Allerdings zeigt ein weiterer Vergleich der hier erzielten Produktivitätswerte, einen signifikanten Unterschied zu den Werten, die in den Erlenmeyerkolbenexperimenten mit CaCO₃ als Neutralisationsmittel erreicht werden. So konnten bei Experimenten mit der gleichen Medienzusammensetzung ca. doppelt so hohe Werte erzielt (siehe Positivkontrolle in der Abbildung 3.23, Seite 77) werden. Für den Unterschied der Werte könnte der hier eingestellte pH-Sollwert von 4,8 verantwortlich sein, welcher möglicherweise suboptimal für die Kultivierung ist und die Zellen durch nicht-dissoziierte Milchsäure gehemmt werden (siehe Kapitel 1.3.5, Seite 12). Aufgrund dieser Tatsache wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Kultivierung der Bakterien untersucht. Des Weiteren ist anzumerken, dass jegliche Versuche den *Sporolactobacillus putidus* unter Schutzgasatmosphäre zu kultivieren (kein Wachstum) fehlgeschlagen sind. Darüber hinaus ist es auch nicht gelungen, den *Sporolactobacillus inulinus* bei höheren Begasungsraten über 0,25 slph zu kultivieren.

3.7.2 Untersuchung über den Einfluss des pH-Werts für die *Sporolactobacillus* Spezies im Bioreaktor

Die verfügbaren Publikationen hinsichtlich der Untersuchungen des pH-Wertes zur Kultivierung der *Sporolactobacillus* Spezies sind sehr limitiert. Lediglich in der Publikation von Fujita *et al.* (2010) werden Daten zu pH-Optima für die hier verwendeten Spezies erhoben. So wird für den *Sporolactobacillus inulinus* IFO 13595/ DSM 20348 ein Optimalbereich von pH 7,0-7,5 angegeben, während die Autoren für den *Sporolactobacillus putidus* DSM 21265 ein Optimum bei pH 4,5 postulieren [85]. Da der angegebene pH-Bereich für den *Sporolactobacillus inulinus* aufgrund der

eigenen Daten (siehe Kapitel 3.3.1, Seite 51 folgende) zu hoch erscheint, ist hier ein pH-Bereich von 4,8 - 6,2 untersucht worden. Somit hatten diese Experimente zum Ziel, einen Optimal-pH-Wert für die *Sporolactobacillus* Spezies zu bestimmen, der als Basis für weitere Kultivierungsexperimente im Reaktorsystem dienen sollte.

3.7.2.1 Variation der pH-Werte für den *Sporolactobacillus inulinus*

Zur Untersuchung der pH-Werte sind Experimente im Batch-Ansatz mit 150,0 g/l Glucosestartkonzentration prozessiert worden. Dazu ist der jeweilig zu untersuchende pH-Wert als Sollwert für die Titration gewählt worden. Um die Experimente untereinander vergleichen zu können, wurde pH 7,5 (mit 3,4 M $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) als Startwert für alle Ansätze eingestellt. Zum Vergleich der Experimente wurde die maximale Produktivität (P_{\max}) in g/(l·h) berechnet. Die Ergebnisse der Experimente hinsichtlich der Variation der pH-Werte in der Abbildung 3.29 für den *Sporolactobacillus inulinus* aufgezeigt.

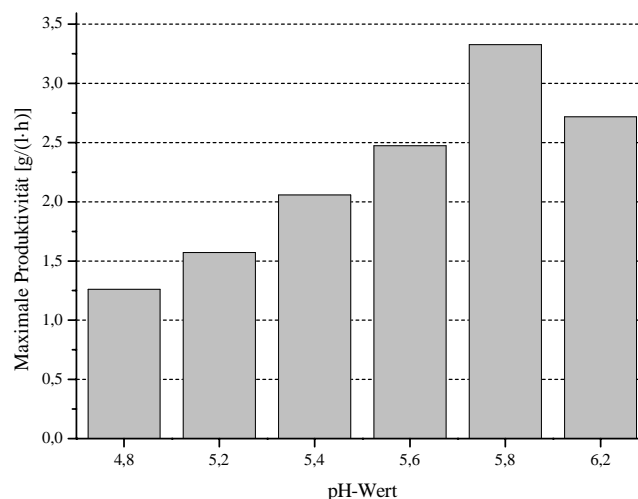


Abbildung 3.29: Variation der pH-Werte für den *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 150,0 g/l Glucose bei 38 °C und 100 RPM Rührgeschwindigkeit. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 0,4. Neutralisationsmittel: 3,4 M $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Start-pH-Wert: 7,5.

Aus der Abbildung wird deutlich, dass sich die Produktivität der Bakterien mit steigendem pH-Wert erhöht. Der geringste P_{\max} -Wert wird bei pH 4,8 mit 1,26 g/(l·h) erzielt. Infolgedessen zeigen die Experimente bei pH 5,2 eine maximale Produktivität von 1,57 g/(l·h) auf, während die Ansätze bei pH 5,4 und 5,6 eine Steigerung von P_{\max} auf 2,06 und 2,47 g/(l·h) erreichen. Darüber hinaus kann ein Maximalwert hinsichtlich P_{\max} bei pH 5,8 mit 3,33 g/(l·h) aus der Grafik entnommen werden. Des Weiteren nimmt die maximale Produktivität der Bakterien bei pH 6,2 mit 2,72 g/(l·h) wieder ab. Zusätzlich sind die Daten der D-Lactatkonzentration nach 40 h (für die Dauer der Lag-Phase), die Gesamtproduktivität und die Produktendkonzentration (nach 96 h) als weitere Parameter hinzugezogen worden. Diese Werte sind in der Tabelle 3.10 aufgelistet.

Tabelle 3.10: Ergebnisse der pH-Wert-Variation für den *Sporolactobacillus inulinus*.

pH-Sollwert	D-Lactat [g/l] nach 96 h	Gesamtproduktivität [g/(l·h)] nach 96 h	D-Lactat [g/l] nach 40 h	Titrationvolumen [ml]
4,8	52,5	0,53	25,7	17,7
5,2	66,2	0,69	19,4	31,8
5,4	85,8	0,90	20,3	39,0
5,6	86,3	0,89	32,5	42,0
5,8	90,9	0,95	58,5	50,3
6,2	84,0	0,87	27,7	48,0

Unter Berücksichtigung der Gesamtproduktivität und der Produktendkonzentration nach 96 h ist ersichtlich, dass die Bakterien in einem pH-Bereich von 5,4 – 6,2 vergleichbare Ergebnisse erzielen. Dennoch bestätigen die Werte hinsichtlich der D-Lactatkonzentration nach 40 h und des Gesamttitrationsvolumens, zusammen mit der maximalen Produktivität (Abbildung 3.29), ein deutliches pH-Optimum bei pH 5,8 (Liniendiagramm, siehe Abbildung 5.24, Seite 128).

3.7.2.2 Variation des pH-Werts für den *Sporolactobacillus putidus*

Abweichend zu den Experimenten des *Sporolactobacillus inulinus* sind hier für *Sporolactobacillus putidus* initial 120,0 oder 130,0 g/l Glucose im Batch-Verfahren verwendet worden. Für die Vergleichbarkeit der Experimente untereinander, wurde als Startwert pH 6,0 mit einer 3,4 M Ammoniaklösung (6,3 %) eingestellt. Ferner sind die Ergebnisse der Experimente bzgl. der Variation der pH-Werte (4,6, 5,0, 5,2, 5,4, 5,6 und 5,8) in der Abbildung 3.30 anhand der maximalen Produktivität [g/(l·h)] erfasst.

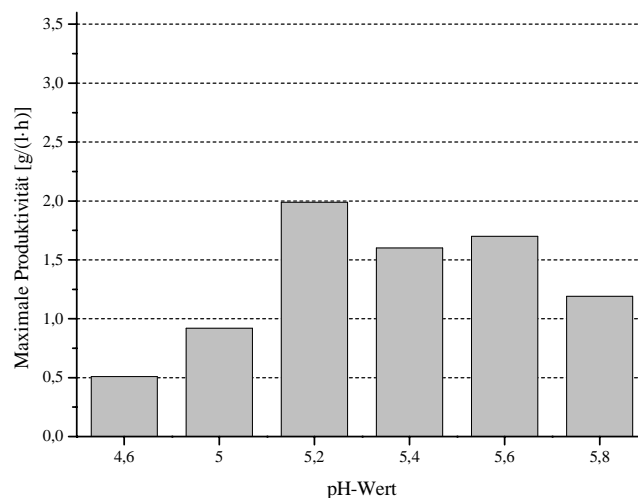


Abbildung 3.30: Variation der pH-Werte für den *Sporolactobacillus putidus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 130,0 g/l Glucose bei 38 °C und 100 RPM Rührgeschwindigkeit. 4,0 % Inokulum einer Vorkultur bei einer OD₆₀₅ von 0,4. Neutralisationsmittel: 3,4 M NH₃·H₂O. Start-pH-Wert: 6,0.

Die Abbildung veranschaulicht, dass die Bakterien bei den pH-Werten 4,6 und 5,0 eine geringere maximale Produktivität aufweisen als im pH-Bereich von 5,2–5,8. So werden bei pH 4,6 und pH 5,0 Werte von 0,51 und 0,92 g/(l·h) erreicht, wohingegen P_{\max} ein Optimum bei pH 5,2 mit 1,99 g/(l·h) erzielt. Des Weiteren werden bei pH 5,4 und pH 5,6 P_{\max} -Werte von 1,60 und 1,70 g/(l·h) erreicht, während der Wert für die Experimente bei pH 5,8 auf 1,19 g/(l·h) abnimmt. Hinzukommend sind die Werte der Gesamtproduktivität, der Übergang zur exponentiellen Phase (D-Lactatkonzentration nach 64 h) und die Produktendkonzentration (nach 160 h) in der Tabelle 3.11 zusammengefasst worden. Die Daten verdeutlichen, dass die Bakterien in einem Bereich von pH 5,2 bis 5,8 ähnliche Produktkonzentrationen erreichen. Demgegenüber weisen die Ansätze zwischen pH 5,2 - 5,6 die höchste Gesamtproduktivität auf, wobei der höchste P_{\max} -Wert für pH 5,2 (Abbildung 3.30) ermittelt werden konnte. Somit kann das pH-Optimum für die D-Lactatproduktion für pH 5,2 bestimmt werden.

Tabelle 3.11: Ergebnisse der pH-Wert-Variation für den *Sporolactobacillus putidus*.

pH-Sollwert	D-Lactat [g/l] nach 160 h	Gesamtproduktivität [g/(l·h)] nach 160 h	D-Lactat [g/l] nach 64 h	Titrationvolumen [ml]
4,6	37,5	0,23	14,6	13,7
5,0	36,7	0,23	1,6	14,5
5,2	53,8 ^A	0,58 ^A	20,9	22,2 ^A
5,4	56,4 ^B	0,59 ^B	18,6	23,0 ^B
5,6	54,8 ^B	0,57 ^B	9,2	24,3 ^B
5,8	57,7	0,36	15,3	20,2

^A: Berechnung der Werte nach 92 h. ^B: Berechnung der Werte nach 96 h.

Im Vergleich mit den Literaturdaten ergeben sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der Ergebnisse bezüglich des Optimal-pH-Werts. Fujita *et al.* (2010) gibt einen Optimalwert bei pH 4,5 an, wohingegen der hier bestimmte Wert bei 5,2 liegt. Diese unterschiedlichen Resultate sind möglicherweise auf die unterschiedliche Methodik zurückzuführen. Im Gegensatz zu den hier durchgeführten Experimenten, wurde bei Fujita *et al.* (2010) der jeweilig zu untersuchende pH-Wert vor Beginn der Kultivierung eingestellt und anhand der optischen Dichte, aus einer Flüssigkultur nach 24 Stunden bestimmt [85]. Anhand dieser Vorgehensweise kann der Wert für das optimale Wachstum möglicherweise mit einer Stressantwort der Zellen auf den niedrigen pH-Wert missinterpretiert werden. Dadurch könnten die Zellen zu kurzzeitig schnellerer Teilung stimuliert werden. In dieser Arbeit wurden die unterschiedlichen Ansätze bei einem definierten pH-Wert gestartet und unterschiedliche pH-Sollwerte eingestellt, die im Laufe der Kultivierung durch die Titration von Ammoniakwasser konstant gehalten wurden. Demzufolge sind die hier erzielten Ergebnisse weniger Anfällig für Fehlinterpretationen hinsichtlich einer möglichen Stressantwort der Bakterien.

Schlussfolgerung: Vergleicht man die Ergebnisse hinsichtlich beider *Sporolactobacillus* Spezies miteinander, so wird deutlich, dass das eingesetzte Neutralisationsmittel zur Kultivierung für den *Sporolactobacillus putidus* weniger gut geeignet ist als für den *Sporolactobacillus inulinus*. Im Vergleich zum *Sporolactobacillus inulinus* wird mit Ammoniakwasser unter diesen Bedingungen eine geringere Gesamtproduktivität (61,0 % des *S. inulinus*) und Ausbeute (nur ca. 62,0 % des *S. inulinus* im Optimalbereich) an D-Lactat erzielt. Die Daten bezüglich der Ausbeute beider Spezies sind in der Tabelle 3.12 zusammengefasst.

Tabelle 3.12: Zusammenhang zwischen den getesteten pH-Werten und der Ausbeute für die *Sporolactobacillus* Spezies.

<i>S.inulinus</i> pH-Wert	Ausbeute [%] nach 96 h	<i>S.putidus</i> pH-Wert	Ausbeute [%] nach 160 h
4,8	34,7	4,6	35,7
5,2	57,7	5,0	48,0
5,4	78,9	5,2	56,6 ^A
5,6	81,3	5,4	56,0 ^B
5,8	90,9	5,6	52,0
6,2	83,2	5,8	59,2

^A: Berechnung der Werte nach 92 h. ^B: Berechnung der Werte nach 96 h.

Darüber hinaus zeigt sich ein weiterer Unterschied beider Spezies durch die Tatsache, dass der *Sporolactobacillus putidus* einen pH-Bereich von 5,2 bis 5,6 für die optimale D-Lactatproduktion besitzt, wobei der höchste P_{\max} -Wert für pH 5,2 bestimmt werden konnte. Hingegen liegt das pH-Optimum für den *Sporolactobacillus inulinus* bei einem pH-Wert von 5,8. Des Weiteren zeigen die Ansätze beider Spezies ein sehr geringes Nebenproduktspektrum bei der Kultivierung im Bioreaktor mit (3,4 M) $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ auf. Für den *Sporolactobacillus inulinus* beträgt die Summe der Nebenprodukte (pH-Optimum) im Durchschnitt 1,6 g/l, während der *Sporolactobacillus putidus* durchschnittlich 1,5 g/l Nebenprodukte zum Ende der Kultivierung produziert hat.

3.7.3 Einfluss des Inokulums auf die Kultivierung der *Sporolactobacillus* Spezies im Erlenmeyerkolben

Die Intention dieser Experimente war es, den Einfluss der Startbiomasse auf die D-Lactatproduktion der *Sporolactobacillus* Spezies zu untersuchen. Es sollte dabei festgestellt werden, inwiefern die Lag-Phase der Bakterien verkürzt bzw. die maximale Produktivität erhöht werden kann, um die Zeiteffizienz der Kultivierungsexperimente insgesamt zu steigern. Des Weiteren sind die verschiedenen Inokula (in Volumenprozent) bei den hier durchgeführten Experimenten anhand der optischen Dichte der Vorkultur referenziert worden, um einen Bezug zur eingesetzten Biomasse herzustellen.

3.7.3.1 Einfluss des Inokulums auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus*

Bei der Variation der Inokula sind vier Verschiedene Experimente prozessiert worden. Der erste Ansatz (OD 04 4%) bedeutet, dass vier Prozent einer Vorkultur mit einer optischen Dichte bei 605 nm (OD_{605}) von 0,4 als Inokulum verwendet worden sind. Bei dem zweiten Experiment (OD 04 10%) wurde ebenfalls eine Vorkultur bei einer OD von 0,4 mit zehn Prozent Inokulum verwendet. Der dritte Ansatz (OD 1 10%) zeigt ein Inokulum von zehn Prozent bei einer OD_{605} von 1,0 und das vierte Experiment (OD 2 10%) steht für ein Inokulum von ebenfalls zehn Prozent bei einer OD_{605} von 2,0. Die Ergebnisse der Experimente sind in der Abbildung 3.31 anhand der maximalen Produktivität [g/(l·h)] nach 92 h und anhand der D-Lactatkonzentration [g/l] nach 24 h (Maß für die Lag-Phase) aufgetragen.

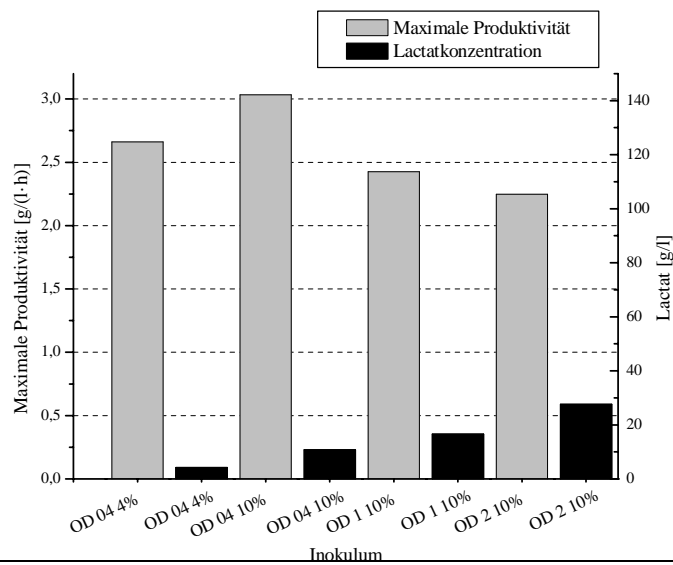


Abbildung 3.31: Variation der Inokula hinsichtlich des *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 150,0 g/l Glucose bei 38 °C und 120 RPM Rührgeschwindigkeit. Neutralisationsmittel: 60,0 g/l $CaCO_3$.

Aus der Abbildung ist zu erkennen, dass die maximale Produktivität den höchsten Wert mit 3,03 g/(l·h) bei dem Experiment OD 04 10% erreicht. Demgegenüber nehmen die Werte für die Experimente OD 1 10% und OD 2 10% mit 2,43 und 2,25 g/(l·h) wieder ab. Darüber hinaus ist hier anzumerken, dass eine OD_{605} von 2,0 den Maximalwert bezüglich der Vorkultur darstellt, da bei diesem Wert die Glucose vollständig verbraucht ist (bei 20 g/l Glucosestartkonzentration und nach 44 Stunden Inkubation).

Zieht man des Weiteren die Werte der D-Lactatkonzentrationen (nach 24 h) hinzu, so fällt auf, dass die Tendenz umgekehrt proportional zu der maximalen Produktivität ist und die Bakterien mit steigendem Inokulum mehr D-Lactat produzieren. So erreicht das Experiment OD 04 4% einen Wert von 4,2 g/l und der Ansatz OD 04 10% erzielt nach 24 h 10,8 g/l D-Lactat. Zudem konnte bei dem Experiment OD 1 10% zum selben Zeitpunkt 16,6 g/l D-Lactat gemessen werden, während der Ansatz OD 2 10% zu diesem Zeitpunkt eine Produktkonzentration von 27,7 g/l erreicht. Um diese Daten auf den Gesamtprozess zu relativieren, wurden zusätzlich die Parameter der Produktendkonzentration und die

Gesamtproduktivität nach 92 h erhoben. Die Ergebnisse hinsichtlich dieser Werte sind in der Tabelle 3.13 aufgelistet.

Tabelle 3.13: Ergebnisse der Inokulavariation für den *Sporolactobacillus inulinus*.

Inokulum	D-Lactat [g/l] nach 92 h	Gesamtproduktivität [g/(l·h)] nach 92 h	pH-Wert nach 16 h
OD 04 4%	105,2	1,14	5,73
OD 04 10%	111,5	1,21	5,41
OD 1 10%	100,4	1,09	4,93
OD 2 10%	99,9	1,09	4,67

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die Werte für die Produktendkonzentration und der Gesamtproduktivität bei den vier Ansätzen ähnlich sind. Somit hat die Variation der Inokula nur einen geringen Einfluss das Ergebnis hinsichtlich des Gesamtprozesses (anhand der Gesamtproduktivität bzw. der Produktendkonzentration) nach 92 h. Zieht man weiterhin die pH-Werte nach 16 h hinzu, so kann man erkennen, dass diese mit steigendem Inokulum deutlich sinken.

Korreliert man nun die Ergebnisse der maximalen Produktivität, Produktendkonzentration und der Gesamtproduktivität mit den pH-Werten nach 16 h, so kann man folgern, dass die pH-Pufferung (60,0 g/l CaCO₃) möglicherweise zu Beginn der Kultivierung ungenügend ist (Liniendiagramm siehe Abbildung 5.26 im Anhang, Seite 129). Möglicherweise geraten die Zellen aufgrund der suboptimalen Pufferung (OD 1 10% und OD 2 10%) in eine Stresssituation (pH-Stress), die die Teilungsfähigkeit im weiteren Verlauf der Kultivierung negativ beeinflusst und somit die Resultate hinsichtlich der Experimente erklären könnte. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für diese Resultate könnte sein, dass die Zellen infolge von Substratkonzentrationen über 100,0 g/l Glucose generell gehemmt werden (siehe Kapitel 3.4.5, Abbildung 3.16, Seite 60). Zusätzlich könnte auch eine Limitierung an wichtigen Wachstumsfaktoren aufgrund der gesteigerten Biomasse und dessen erhöhten Verbrauch diese Ergebnisse erklären.

3.7.3.2 Einfluss des Inokulums auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus putidus*

Zur Untersuchung der Einflüsse von verschiedenen Inokula auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus putidus* sind drei Experimente durchgeführt worden. Der erste Ansatz entspricht einer optischen Dichte der Vorkultur von 0,4 und vier Prozent Inokulum (OD 04 4%). Das zweite Experiment (OD 1 10%) und der dritte Ansatz (OD 2 10%) sind jeweils mit zehn Prozent Vorkultur und einer OD₆₀₅ von 1,0 bzw. von OD₆₀₅ 2,0 angesetzt worden. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der Abbildung 3.31 anhand der maximalen Produktivität [g/(l·h)] nach 96 h und durch die D-Lactatkonzentration [g/l] nach 40 Stunden (als Maß für die bakterielle Lag-Phase) dargestellt.

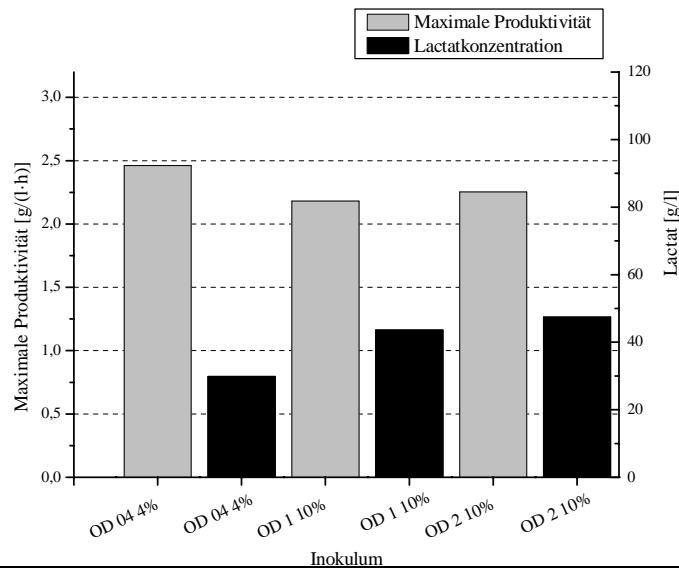


Abbildung 3.32: Variation der Inokula hinsichtlich des *Sporolactobacillus putidus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 120,0 g/l Glucose bei 38 °C und 120 RPM Rührgeschwindigkeit. Neutralisationsmittel: 60,0 g/l CaCO₃.

Die Abbildung verdeutlicht, dass die Experimente hinsichtlich der maximalen Produktivität ähnliche Werte aufweisen. So erreicht die Produktivität bei dem Ansatz OD 04 4% einen Maximalwert (P_{\max}) von 2,46 g/(l·h), während das Experiment OD 1 10% eine Produktivität von 2,18 g/(l·h) erzielt. Der Ansatz OD 2 10% weist wiederum einen Wert von 2,25 g/(l·h) auf. Hingegen zeigen die Werte der D-Lactatkonzentration nach 40 h eine Verkürzung des Übergangs zur exponentiellen Phase mit steigender Startbiomasse auf. Das Experiment OD 04 4% erzielt eine Produktkonzentration von 29,9 g/l, wohingegen (nach 40 h) bei den Ansätzen OD 1 10% und OD 2 10% Produktkonzentrationen von 43,6 und 47,5 g/l gemessen werden konnten. Darüber hinaus sind die Parameter der Produktendkonzentration und Gesamtproduktivität nach 96 h Kultivierungsdauer in der Tabelle 3.14 aufgelistet.

Tabelle 3.14: Ergebnisse der Inokulavariation für den *Sporolactobacillus putidus*.

Inokulum	D-Lactat [g/l] nach 96 h	Gesamtproduktivität [g/(l·h)] nach 96 h	pH-Wert nach 24 h
OD 04 4%	92,0	1,00	5,60
OD 1 10%	94,6	1,03	5,67
OD 2 10%	98,3	1,07	5,69

Die Daten in der Tabelle zeigen tendenziell eine gesteigerte Produktendkonzentration und Gesamtproduktivität mit höherer Startbiomasse auf. Des Weiteren scheint der pH-Wert, abweichend zu den Resultaten für den *Sporolactobacillus inulinus*, bei diesen Experimenten nur einen geringen Einfluss zu haben, da die pH-Werte nach 24 h in den Ansätzen sehr ähnlich sind (Liniendiagramm siehe Abbildung 5.27 im Anhang, Seite 129).

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse für den *Sporolactobacillus putidus* zeigen einen Maximalwert für P_{\max} von 2,46 g/(l·h) bei 4,0 % Inokulum ($OD_{605} = 0,4$ der Vorkultur) auf. Des Weiteren kann den Daten entnommen werden, dass ein schnellerer Übergang zur exponentiellen Phase mit steigender Startbiomasse eintritt. Hingegen veranschaulichen die Resultate der Experimente für den *Sporolactobacillus inulinus*, dass der höchste Wert für die maximale Produktivität von 3,03 g/(l·h) bei 10,0 % Inokulum ($OD_{605} = 0,4$ der Vorkultur) ermittelt werden kann, wobei der Ansatz mit 10,0 % Inokulum ($OD_{605} = 2,0$ der Vorkultur) den niedrigsten P_{\max} -Wert mit 2,25 g/(l·h) erreicht. Da dieser Ansatz aber die geringste Lag-Phase aufwies (27,7 g/l D-Lactat nach 24 h), soll in weiteren Experimenten die Reaktionsführung untersucht werden, um die maximale Produktivität zu steigern (siehe Kapitel 3.7.4.1).

3.7.4 Neutralisationsmittel und Reaktionsführung

Als zu untersuchende Neutralisationsmittel für die Optimierung der biotechnologischen Produktion von D-Lactat wurden CaCO_3 und Ammoniakwasser ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) gewählt, da diese im Vergleich zu NaOH kostengünstiger in der Beschaffung sind (Siehe Kapitel 1.5, Seite 16). Anhand der Reaktionsführung soll getestet werden, wie diese am effizientesten zur D-Lactatherstellung eingesetzt werden können. Darüber hinaus wurden die weiteren Untersuchungen nur noch mit den *Sporolactobacillus inulinus* durchgeführt, da er gegenüber den *Sporolactobacillus putidus* verbesserte Eigenschaften besitzt. Diese sind im Folgenden beschrieben.

- Der *Sporolactobacillus inulinus* ist toleranter hinsichtlich höherer Substratstartkonzentrationen als der *Sporolactobacillus putidus* und weist dementsprechend höhere Produktivitätswerte auf (siehe Kapitel 3.4.5 und Kapitel 3.4.6, Seiten 60 - 64).
- Des Weiteren kann der *Sporolactobacillus inulinus* mehr Zuckerspezies zur D-Lactatproduktion nutzen (siehe Tabelle 3.9, Seite 74) und erreicht eine höhere Gesamtproduktivität bei der Verwendung von alternativen C-Quellen als der *Sporolactobacillus putidus* (siehe Kapitel 3.6, Seite 76 folgende).
- Darüber hinaus ist Ammoniakwasser für die Kultivierung des *Sporolactobacillus putidus* im Bioreaktor deutlich weniger gut geeignet als für den *Sporolactobacillus inulinus*, da vergleichsweise nur Ausbeuten von ca. 57,0 % erzielt wurden und die Produktivitätswerte (Gesamtproduktivität und P_{\max}) für D-Lactat deutlich geringer sind.

3.7.4.1 Untersuchung zur Reaktionsführung im Erlenmeyerkolben für den *Sporolactobacillus inulinus* mit CaCO_3 als Neutralisationsmittel

Das Ziel dieser Experimente ist es, eine geeignete Reaktionsführung hinsichtlich der D-Lactatproduktion mit CaCO_3 als Neutralisationsmittel zu ermitteln. Die Ergebnisse bezüglich der Einflüsse verschiedener Inokula für den *Sporolactobacillus inulinus* hatten ergeben, dass ein Inokulum von 10,0 % ($\text{OD}_{605} = 2,0$ der Vorkultur) die Lag-Phase der Bakterien wesentlich verkürzen kann, wenn auch die maximale Produktivität für dieses Experiment am geringsten war (siehe Abbildung 3.31, Seite 89).

Daher sollte unter kontrollierten Bedingungen im Fed-Batch versucht werden, den P_{\max} -Wert bei höherer Startbiomasse zu steigern. Um eine mögliche Substratinhibition bei höheren Substratkonzentrationen ($>100,0 \text{ g/l}$) kategorisch auszuschließen, wurde das Fed-Batch-Experiment (FB) mit reduzierter Glucosestartkonzentration ($79,7 \text{ g/l}$) bei gleichbleibender CaCO_3 -Startkonzentration ($60,0 \text{ g/l}$) gestartet. Die Ergebnisse Fed-Batch-Experiments sind in der Abbildung 3.33 anhand der D-Lactat- bzw. Glucosekonzentration $[\text{g/l}]$ sowie des pH-Verlaufs aufgetragen.

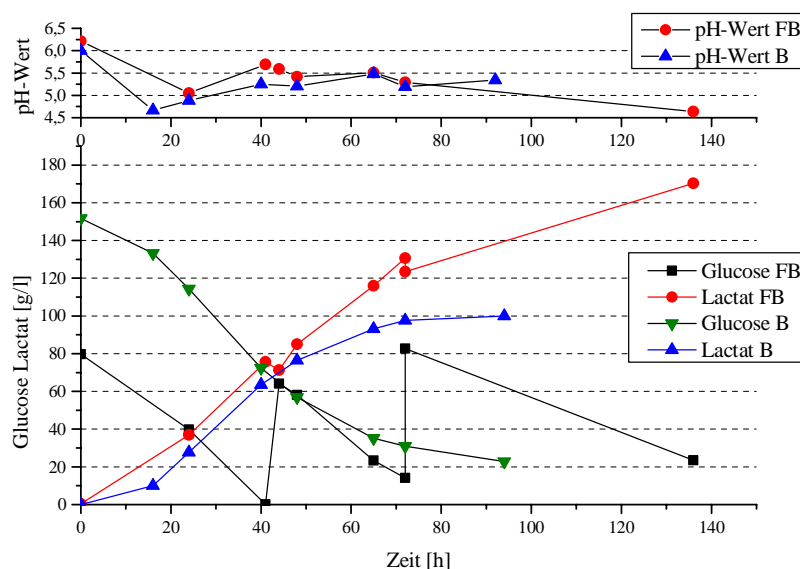


Abbildung 3.33: Einfluss der Reaktionsführung (Batch und Fed-Batch) für den *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) bei 38 °C und 120 RPM Rührgeschwindigkeit. 10,0 % Inokulum ($\text{OD}_{605}=2,0$ der Vorkultur) Neutralisationsmittel: $60,0 \text{ g/l CaCO}_3$. Glucosestartkonzentration Batch (B) 150 g/l und im Fed-Batch $79,7 \text{ g/l}$.

Im Vergleich dazu, ist der Kurvenverlauf des Batch-Experiments (B) mit $150,0 \text{ g/l}$ Glucosestartkonzentration (Kapitel 3.7.3.1, Seite 89), bei gleichem Inokulum (10,0 % einer Vorkultur bei $\text{OD}_{605} = 2,0$) und gleicher Medienzusammensetzung dargestellt. Aus der Abbildung ist zu entnehmen, dass die Produktkonzentrationen mit $37,0 \text{ g/l}$ D-Lactat nach 24 h und $75,6 \text{ g/l}$ nach 41 h im Fed-Batch-Ansatz höher sind als im Vergleich zum Batch-Experiment ($27,7 \text{ g/l}$ nach 24 h und $63,6 \text{ g/l}$ nach 40 h). Zusätzlich ist zu erkennen, dass die Produktivität im Batch-Ansatz ab 40 h Kultivierungsdauer sukzessive abnimmt. Nach 65 h beträgt diese nur noch $0,98 \text{ g/(l}\cdot\text{h)}$. Im Gegensatz dazu zeigt der Kurvenverlauf des Fed-Batch-Experiments, dass die Glucose nach 42 h komplett

verbraucht ist. Da der zweite Glucose-Feed (64,1 g/l und weitere 30,0 g/l CaCO_3) aber erst nach 44 h erfolgt ist, kann daraus geschlossen werden, dass die Bakterien unempfindlich gegenüber einer Limitierung der Kohlenstoffquelle sind, da sie nach erneuter Glucosezufuhr ohne signifikanten Produktivitätsverlust weiter D-Lactat bilden. Nach 72 h erfolgte der dritte Feed (mit 68,7 g/l Glucose), wobei zu diesem Zeitpunkt eine Produktkonzentration von 130,6 g/l gemessen werden konnte.

Letztendlich ist das Experiment nach 136 h beendet worden, da zum einen der pH-Wert für die weitere Kultivierung in einem suboptimalen Bereich lag. Zum anderen ist das ausfallende Calciumlactat sehr hygroskopisch, wodurch die Viskosität der Suspension stark zunimmt. Durch die hohe Viskosität sinkt wiederum der Massentransport im Reaktionsgefäß, folglich wäre eine erneute Zufuhr von CaCO_3 ineffektiv. Die Werte der Endkonzentrationen, der maximalen Produktivität und Ausbeute bezüglich des Batch- und Fed-Batch-Experiments sind in der Tabelle 3.15 aufgelistet.

Tabelle 3.15: Vergleich von Ergebnisdaten der Batch- und Fed-Batch-Experimente.

Reaktionsführung	D-Lactat [g/l]	P_{\max} [g/(l·h)]	Ausbeute [%]	Kultivierungszeit [h]
Fed-Batch	170,4	3,44	80,6	136
Batch	99,9	2,25	65,9	96

Schlussfolgerung: Die Daten in der Tabelle zeigen, dass durch die Reaktionsführung mittels Fed-Batch die D-Lactatkonzentration signifikant erhöht werden kann, während die maximale Produktivität um ca. 35,0 % und die Ausbeute um 15,0 % gesteigert werden können. Zudem kann die schlechte Ausbeute bezüglich des Batch-Experiments mit der Tatsache erklärt werden, dass die Produktivität ab 65 h signifikant abnimmt und der Prozess zum Erliegen kommt. Der Grund für die deutlichen Unterschiede beider Experimente kann hier nur mit der Tatsache erklärt werden, dass im FB-Ansatz bei 44 h, neben Glucose auch zusätzlich 30,0 g/l CaCO_3 supplementiert worden sind. Dies hatte zur Folge, dass sich der pH-Wert im Vergleich zum Batch-Ansatz näher am Optimum befand (siehe Abbildung 3.33 und Abbildung 3.29, Seite 85). Dadurch könnte die Reproduktion der Zellen im weiteren Verlauf positiv beeinflusst worden sein und folglich die erhöhte D-Lactatproduktion über Gesamtprozess begründen. Eine Substratinhibition der Zellen durch eine höhere Glucosestartkonzentration im Batch-Versuch kann hier ausgeschlossen werden, da beide Experimente vergleichbare Produktivitätswerte zwischen 24 und 41 h aufweisen (2,25 g/(l·h) im Batch und 2,28 g/(l·h) im Fed-Batch). Des Weiteren können diesem Ergebnis (FB) noch weitere wichtige Informationen entnommen werden. So können mit 10,0 g/l Hefeextrakt ca. 190,0 g/l Glucose umgesetzt werden. Dies bedeutet, dass die Bakterien das vorhandene Nährstoffangebot effizient nutzen können und dass mögliche Limitierungen durch wichtige Medienkomponenten, wie z.B. Stickstoff und Phosphat, für das Batch-Experiment ausgeschlossen werden können. Ungeachtet dessen soll in weiteren Reaktorexperimenten getestet werden, ob die Kultivierungsdauer durch eine Steigerung der Gesamtproduktivität noch weiter reduziert werden kann.

3.7.4.2 Optimierung der D-Lactatproduktion im Bioreaktor für den *Sporolactobacillus inulinus* mit CaCO_3 als Neutralisationsmittel

Anhand der Ergebnisse der Reaktionsführung (siehe Kapitel 3.7.4.1, Seite 93) sollte nun untersucht werden, inwiefern die Gesamtproduktivität der Bakterien im Bioreaktor mit CaCO_3 als Neutralisationsmittel mittels Fed-Batch (FB) gesteigert werden kann. Dazu sind Experimente mit unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten prozessiert worden (FB1 bei 750 RPM und FB2 bei 250 RPM). Die Variation der Rührung sollte diesbezüglich den Zusammenhang zwischen dem Verteilungskoeffizienten des suspendierten CaCO_3 und den pH-Verlauf der Kultivierung aufzeigen. Somit sollte die bessere Homogenisierung von Neutralisationsmittel und Medium eine effizientere Pufferung bei gleicher Massenkonzentration von CaCO_3 (60,0 g/l) sicherstellen. Die Ansätze sind mit 10,0 % Inokulum ($\text{OD}_{605}=2,0$ der Vorkultur) und mit 90,0 g/l Glucose gestartet worden. Die Ergebnisse der Experimente sind in der Abbildung 3.34 anhand der D-Lactat- bzw. Glucosekonzentration [g/l] gegen die Zeit [h] sowie des pH-Verlaufs illustriert.

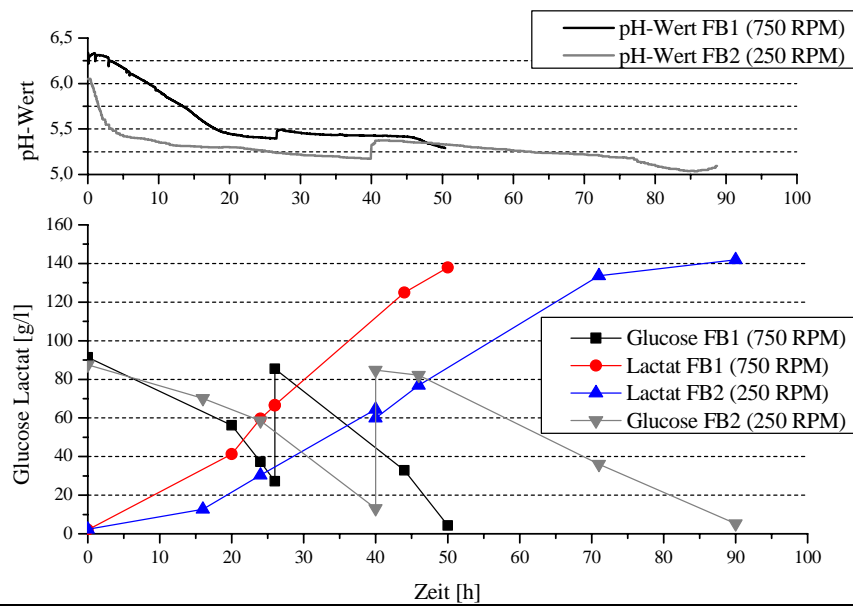


Abbildung 3.34: Einfluss der Rührgeschwindigkeit im Bioreaktor für den *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 90 g/l Glucose bei 38 °C. 10,0 % Inokulum ($\text{OD}_{605}=2,0$ der Vorkultur) Neutralisationsmittel: 60,0 g/l CaCO_3 . Rührgeschwindigkeit: FB1 750 RPM und FB2 250 RPM.

Die Abbildung zeigt, dass bei höherer Rührgeschwindigkeit die Pufferung durch das suspendierte CaCO_3 effektiver ist und demzufolge ist auch die Produktivität an D-Lactat durch die Bakterien höher. So erzielt der Ansatz bei FB1 (750 RPM) nach 24 h eine fast doppelt so hohe Produktkonzentration (59,6 g/l) als im Experiment FB2 (30,3 g/l), wo diese Konzentration (64,5 g/l) erst nach 40 h erreicht wird. Der zweite Feed ist beim Ansatz FB1 nach 28 h erfolgt, wobei hier ergänzend zu 58,3 g/l Glucose, 15,0 g/l CaCO_3 zugeführt worden sind, um den pH-Wert über pH 5,5 zu halten. Dagegen ist beim Ansatz mit 250 RPM Rührgeschwindigkeit (FB2) der zweite Feed (71,6 g/l Glucose) erst nach 40 h erfolgt, wobei hier 30,0 g/l CaCO_3 nötig waren, um den pH-Wert bei ca. 5,5 zu halten. Zusätzlich wurde ab 44 h

beim Experiment FB1 die Rührung auf 1000 RPM erhöht um angesichts der hohen Viskosität durch das präzipitierte Calciumlactat, die weitere Durchmischung im Bodenbereich der Reaktoren aufrechtzuerhalten. Das Experiment ist bei nahezu komplettem Verbrauch der Glucose nach 50 h beendet worden, während die Glucose beim Experiment FB2 erst nach 90 h annähernd vollständig umgesetzt wurde. Weiterhin sind die Werte der Endkonzentrationen, der Produktivität und Ausbeute der Kurven nach 50 h (FB1) bzw. 90 h (FB2) in Tabelle 3.16 aufgelistet.

Tabelle 3.16: Fed-Batch-Experimente mit CaCO_3 als Neutralisationsmittel für den *Sporolactobacillus inulinus*.

Experiment	D-Lactat [g/l]	Restglucose [g/l]	Gesamt-Produktivität [g/(l·h)]	Insgesamt eingesetztes CaCO_3 [g/l]	Ausbeute [%]	Selektivität [%]
FB1	137,9	4,3	2,82	75	94,9	95,0
FB2	141,9	5,3	1,58	90	89,2	92,2

Schlussfolgerung: An den Werten in der Tabelle ist erkennbar, dass eine Verbesserung der Pufferung durch eine gesteigerte Rührung (um 500 RPM) fast zu einer Verdoppelung der Gesamtproduktivität führt (FB1), wobei in beiden Experimenten vergleichbare Produktendkonzentrationen und Selektivitätswerte erzielt werden. Zudem konnte hier die Menge (FB1) an eingesetzten CaCO_3 reduziert werden, welche ungefähr dem theoretischen Verhältnis der zur Komplexierung der Lactat-Ionen nötigen Ca^{2+} -Ionen (2:1) entspricht. Demgegenüber konnten die Kultivierungen nach vollständigem Verbrauch der Glucose nicht weiter prozessiert werden. Zu diesem Zeitpunkt war eine Durchmischung des Mediums durch die hohe Viskosität nicht mehr realisierbar. Die Abbildung 3.35 zeigt die Präzipitation von Ca-Lactat im Bioreaktor (FB1) nach 50 h Kultivierungsdauer.



Abbildung 3.35: Präzipitation von Ca-Lactat nach 50 h Kultivierungsdauer im Bioraktor bei 750 RPM.

3.7.4.3 Untersuchung zur Reaktionsführung im Bioreaktor für den *Sporolactobacillus inulinus* mit NH_3 -Lösung als Neutralisationsmittel

Analog zu der Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus* mit CaCO_3 als Neutralisationsmittel, sollte mit Hilfe dieser Experimente getestet werden, welche Reaktionsführung für die Kultivierung mit Ammoniakwasser als Neutralisationsmittel am besten geeignet ist. Dazu sind zum einen Ansätze im Batch-Experiment (B) mit 153,7 g/l Glucose durchgeführt worden. Zusätzlich zu den Batch-Ansätzen, sind Experimente mittels Fed-Batch (FB) bei einer Startkonzentration von 78,5 g/l Glucose durchgeführt worden. Als Inokulum wurden 10,0 % ($\text{OD}_{605}=2,0$ der Vorkultur) verwendet. Darüber hinaus ist bei diesen Experimenten eine 6,8 M (12,5 %) Ammoniaklösung titriert worden, um eine möglichst hohe Produktkonzentration zu erhalten. Der Sollwert für die Titration wurde auf pH 5,8 eingestellt (siehe 3.7.2.1, Seite 85). Die Abbildung 3.36 zeigt die Ergebnisse der Experimente anhand der D-Lactat-bzw. Glucosekonzentration [g/l] und den pH-Verlauf gegen die Zeit [h].

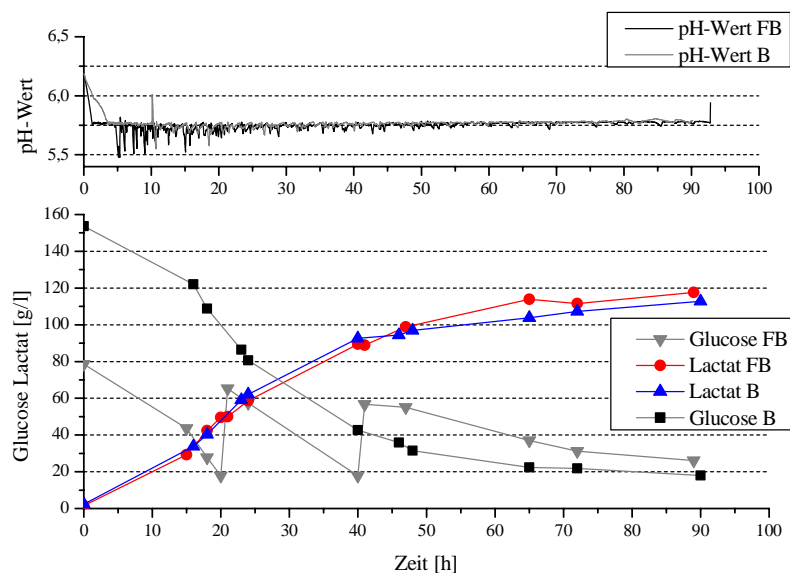


Abbildung 3.36: Untersuchungen zur Reaktionsführung mit $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ im Bioreaktor für den *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit Glucosestartkonzentrationen von 78,5 g/l (FB) und 153,7 g/l (B) bei 38 °C und 250 RPM. 10,0 % Inokulum ($\text{OD}_{605}=2,0$ der Vorkultur). pH-Sollwert: 5,8. Neutralisationsmittel: 6,8 M $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Aus der Abbildung wird deutlich, dass die Reaktionsführung in Abhängigkeit der Glucosestartkonzentration keinen Einfluss auf das Wachstum bzw. auf die Produktivität der Bakterien hat. Beide Ansätze erreichen nach 24 h eine ähnliche Produktkonzentration (58,7 g/l im Fed-Batch-Experiment und 62,2 g/l im Batch-Ansatz). Zudem weisen beide Experimente eine vergleichbare Produktivität auf. Der Batch-Ansatz (B) erzielt einen Wert von 2,32 g/(l·h) und für das Fed-Batch-Experiment (FB) kann ein Wert von 2,23 g/(l·h) nach 40 h berechnet werden. Die Produktkonzentrationen erreichen zu diesem Zeitpunkt 89,5 g/l D-Lactat im Fed-Batch und 92,6 g/l im Batch-Experiment. Darüber hinaus verringert sich die Produktivität der Bakterien signifikant. So beträgt

die aktuelle Produktivität für die Zeit zwischen 40 und 90 h Kultivierungsdauer im Batch nur noch 0,40 g/(l·h), während das Fed-Batch-Experiment für diesen Zeitraum einen Wert von 0,57 g/(l·h) aufweist.

Für die sukzessive Verminderung der Produktivität kann ein Defizit an wichtigen Wachstumsfaktoren basierend auf den Ergebnissen der vorausgegangenen Experimente ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 3.7.4.1, Seite 93 folgende). Demzufolge kann vermutet werden, dass die Zellen durch die steigende Produktkonzentration gehemmt werden. Unter anderem sind die Werte der Endkonzentrationen, der Produktivität und Ausbeute bezüglich der Experimente in der Tabelle 3.18 dargestellt.

Tabelle 3.17: Reaktionsführung mit $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ als Neutralisationsmittel für den *Sporolactobacillus inulinus*.

Experiment	D-Lactat [g/l] nach 90 h	Gesamtproduktivität [g/(l·h)] nach 90 h	Ausbeute [%]	Titrationvolumen [ml]
Batch (B)	112,8	1,25	86,3	18,4
Fed-Batch (FB)	117,6	1,32	90,2	24,7

Schlussfolgerung: Ein Vergleich der Daten der Tabellen Tabelle 3.16 und Tabelle 3.17 zeigt, dass mit beiden Neutralisationsmitteln (CaCO_3 und $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) vergleichbare Ausbeuten erzielt werden können. Hingegen sind die Produktendkonzentration durch die Verdünnung mit $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ geringer und die Produktivität der Bakterien ist im Vergleich zu den CaCO_3 -Ansätzen (siehe Experiment FB1 in der Abbildung 3.34 und der Tabelle 3.16) folglich einer möglichen Produkthemmung verringert. Das Problem der Produktinhibierung durch die Zunahme an nicht-dissoziierter Milchsäure (HLA) im Medium wurde im Kapitel 1.3.5 (Seite 12) erläutert. Für die Zunahme an HLA kann entweder ein abfallender pH-Wert verantwortlich sein oder sie ist die Folge einer hohen Produktkonzentration. Da diese Experimente zur Reaktionsführung bei einem konstanten pH-Wert von 5,8 durchgeführt worden sind, ist es hier möglich, dass die Zellen infolge der steigenden Produktkonzentration bzw. durch dessen Anteil an HLA sukzessive gehemmt werden. Auch wenn Milchsäure (pKs 3,86) eine recht schwache organische Säure ist [62], so konnte Mols *et al.* (2010) bei Experimenten mit *Bacillus cereus* ATCC 14579 aufzeigen, dass 2,0 mM HLA (bei pH 5,5) bereits einen Wachstumsdefekt und eine Veränderung im Pyruvatmetabolismus der Bakterien auslösen können [101]. Des Weiteren konnte dieses Problem mit CaCO_3 als Neutralisationsmittel nicht beobachtet werden. Der Grund dafür könnte sein, dass die Lactatkonzentration auf Grund des geringen Löslichkeitsprodukts ($\sim 100,0$ g/l) des Ca-Lactats auf einem unterkritischen Niveau gehalten wird und somit eine Produktinhibierung vermieden wird [86]. Aus diesem Grund soll in weiteren Experimenten für den *Sporolactobacillus inulinus* geprüft werden, inwiefern eine Steigerung des pH-Werts während der Kultivierung (mit $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ als Neutralisationsmittel) zu einer Erhöhung der Produktendkonzentration bzw. zur Optimierung des Prozesses beitragen kann.

3.7.4.4 Optimierung der D-Lactatproduktion im Bioreaktor mittels pH-Shift für den *Sporolactobacillus inulinus* mit NH_3 -Lösung als Neutralisationsmittel

Der Hintergrund dieser Experimente beruht auf der Publikation von Zhao *et al.* (2014). In diesem Artikel ist experimentell festgestellt worden, dass bei Kultivierungsbedingungen über dem für das Wachstum der Bakterien optimalen pH-Wert, eine Steigerung der D-Lactatproduktion erreicht werden kann [70]. So wurde in dieser Studie ermittelt, dass sich die Zellen bei pH 5,0 und 5,5 besser reproduzieren konnten, aber die D-Lactatproduktion bei pH-Werten größer 6,0 vergleichsweise höher war. Die Autoren begründeten diese Erkenntnis damit, dass bei steigender D-Lactatkonzentration bei pH-Werten von 5,0-5,5 der Anteil an nicht-dissoziierter D-Milchsäure (HLA) ebenfalls zunimmt, welcher die Bakterien bei der weiteren Produktion hemmt.

Im Falle des *Sporolactobacillus inulinus* DSM 20348 kann davon ausgegangen werden kann, dass die D-Lactatproduktion überwiegend wachstumsgekoppelt ist (siehe Kapitel 3.1.1, Seite 43) und die Bakterien sich demnach über pH-Wert 5,8 langsamer reproduzieren (siehe Kapitel 3.7.2.1, Seite 85). Infolgedessen soll getestet werden, ob ein produktkonzentrationsabhängiger pH-Shift (mit 6,8 M $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) auf pH 6,5 die Produktivität der Bakterien steigern kann, ohne die Gesamtprozessdauer zu verlängern. Dazu sind pH-Shift-Experimente bei einer D-Lactatkonzentrationen von 20,0 g/l (Ansatz 1), 50,0 g/l (Ansatz 2), 60,0 g/l (Ansatz 3) und 70,0 g/l (Ansatz 4) durchgeführt worden. Ergänzend dazu, wurden zwei Kontrollen bei kontinuierlichen (Ansatz 5 und Ansatz 6) pH-Werten (5,8 und 6,5) als Referenz angesetzt. Ferner sind die Ergebnisse der Experimente in der Abbildung 3.37 anhand der Gesamtproduktivität [g/(l·h)] nach 51 bzw. 52 Stunden (Ansatz 4) aufgetragen.

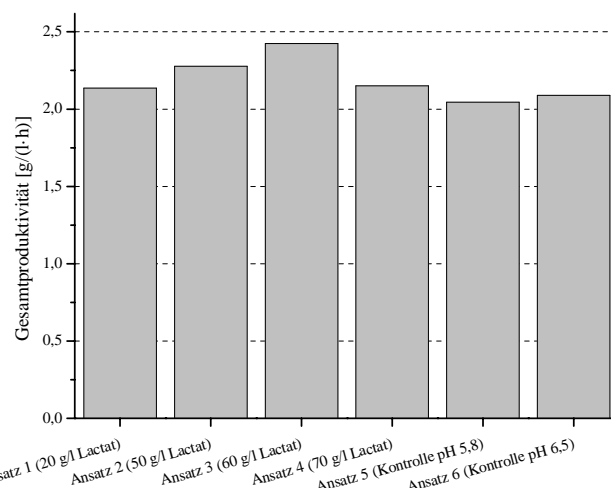


Abbildung 3.37: pH-Shift-Experimente im Bioreaktor für den *Sporolactobacillus inulinus* im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit 93,0 g/l Glucose, bei 38 °C und 250 RPM. 10,0 % Inokulum ($\text{OD}_{605}=2,0$ der Vorkultur). pH-Startwert: 6,2 und pH-Sollwert: 5,8. Neutralisationsmittel: 6,8 M $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass ein pH-Shift während der Kultivierung, im Vergleich zu den

Kontrollansätzen (5 und 6) die Gesamtproduktivität der Zellen steigern kann. So wird bei dem Ansatz (1) eine Gesamtproduktivität von 2,14 g/(l·h), bei dem Ansatz (2) ein Wert von 2,28 g/(l·h) und bei dem Ansatz (4) ein Produktivitätswert von 2,15 g/(l·h) erreicht. Darüber hinaus wurde ein Maximalwert bei dem Ansatz (3) mit 2,48 g/(l·h) erzielt. Die Kontrollansätze (5) und (6) (bei pH 5,8 und pH 6,5) weisen hingegen Werte von 2,04 und 2,09 g/(l·h) auf. Demzufolge ergibt sich für den Ansatz (3) eine Produktivitätssteigerung von 0,42 g/(l·h) oder ca. 17,0 % im Vergleich zu den gemittelten Werten der Kontrollen. Als weitere Parameter wurden die Ausbeute, Endkonzentration und die maximale optische Dichte (OD₆₀₅) hinzugezogen. Diese Werte sind in der Tabelle 3.18 aufgelistet.

Tabelle 3.18: Ergebnisdaten für die pH-Shift-Experimente.

Ansatz	D-Lactat [g/l]	Ausbeute [%]	Maximale OD ₆₀₅
(1) pH-Shift (20,0 g/l Lactat)	111,1	87,2	8,95
(2) pH-Shift (50,0 g/l Lactat)	117,0	96,2	9,64
(3) pH-Shift (60,0 g/l Lactat)	126,1	98,3	10,98
(4) pH-Shift (70,0 g/l Lactat)	113,6	91,4	9,42
(5) Kontrolle pH 5,8	106,4	82,1	10,27
(6) Kontrolle pH 6,5	108,6	83,8	7,30

Die Werte der Tabelle zeigen eine Steigerung der Ausbeute und Produktendkonzentrationen für die Ansätze (2) bis (4), wobei der Ansatz (3) die höchsten Werte erzielt. Des Weiteren ist ersichtlich, dass sich die maximalen OD₆₀₅-Werte hinsichtlich der pH-Shift-Experimente (2) bis (4) und der Kontrolle (5) kaum unterscheiden. Lediglich der Ansatz (1) weist eine geringere maximale OD₆₀₅ auf. Im Gegensatz dazu sind die maximalen OD₆₀₅-Werte für die beiden Kontrollen (5) und (6) deutlich abweichend, wobei die Werte bezüglich der Produktivität, Endkonzentration und Ausbeute annähernd gleich sind.

Schlussfolgerung: Das legt die Vermutung nahe, dass sich die Effekte folglich der Produktinhibition durch HLa bei pH 5,8 und das verringerte Populationswachstum durch suboptimale Bedingungen bei pH 6,5 gegenseitig aufheben und zu ähnlichen Ergebnissen führen. Ferner kann angenommen werden, dass der Ansatz (1) möglicherweise bei zu niedriger Produktkonzentration durchgeführt wurde, so dass die Zellen in Folge bei pH 6,5 zu stark in ihrem Wachstum gehindert worden sind. Umgekehrt wäre dann der Ansatz (4) bei zu hoher Produktkonzentration erfolgt, was dazu führte, dass die Bakterien durch die nicht-dissoziierte Säure inhibiert wurden. In beiden Fällen würde das die niedrigeren Werte entsprechend der Produktivität, Produktendkonzentration und Ausbeute im Vergleich zu den Ansätzen (2) und (3) erklären.

Ergänzend muss noch erwähnt werden, dass alle Experimente mit 10,0% Inokulum ($OD_{605} = 2,0$ der Vorkultur) durchgeführt worden sind. Möglicherweise werden durch die große Anzahl teilungsfähiger Zellen die Unterschiede bezüglich des bakteriellen Wachstums bei den verschiedenen pH-Shift-Experimenten nicht deutlich genug hervorgehoben. Ein geringeres Inokulum könnte daher möglicherweise weiteren Aufschluss bringen.

Darüber hinaus könnten zusätzlich zur Konzentrationsabhängigkeit des pH-Shifts, auch noch weitere pH-Werte unter pH 6,5 getestet werden. Möglicherweise reicht auch eine geringere pH-Steigerung aus um der Produktinhibition durch den Anteil an nicht-dissoziierter Säure effektiv entgegenzuwirken. Zudem würde sich eine geringere pH-Steigerung auch weniger negativ auf das Wachstum der Bakterien auswirken, wodurch letztendlich eine höhere Gesamtproduktivität erzielt werden könnte.

Zusammenfassend sollen an dieser Stelle die Vor- und Nachteile der hier verwendeten Neutralisationsmittel berücksichtigt werden. Neben den allgemeinen, prozesstechnischen Komponenten, sind die in der Tabelle 3.19 aufgelisteten Vor- und Nachteile auch speziell auf den hier verwendeten Biokatalysator *Sporolactobacillus inulinus* abgestimmt worden. Demzufolge könnte die Produktinhibition aufgrund von nicht-dissoziierter Säure bei der Verwendung eines anderen Biokatalysators bei einer anderen D-Lactatkonzentration oder ggf. gar nicht erfolgen.

Tabelle 3.19: Vor- und Nachteile der verwendeten Neutralisationsmittel.

Neutralisationsmittel	Vorteile	Nachteile
$CaCO_3$	<ul style="list-style-type: none"> • In der Anschaffung kostengünstig • Keine Produktinhibition der Zellen • Hohe Produktkonzentration 	<ul style="list-style-type: none"> • Hoher verfahrenstechnischer Aufwand hinsichtlich der Produktaufreinigung • Chemikalienintensiv (H_2SO_4) • Anfallende Nebenprodukte ($CaSO_4$)
$NH_3 \cdot H_2O$	<ul style="list-style-type: none"> • Destillative Rückgewinnung bei der Produktaufreinigung • Produktaufreinigung in wenigen Prozessschritten • Keine Nebenprodukte bei der Aufreinigung 	<ul style="list-style-type: none"> • Produktinhibition der Zellen möglich • Verminderte Produktkonzentration durch Verdünnung

3.8 Repeated-Batch-Experimente mit immobilisierten Zellen des *Sporolactobacillus inulinus* im Erlenmeyerkolben

Immobilisierte Zellen sind aufgrund der hohen Populationsdichte, im Vergleich zu freien Zellen, weniger anfällig gegenüber Substrat- und Produktinhibierung und können zudem, z. B. bei Repeated-Batch und kontinuierlichen Fermentationsmethoden, eine höhere Langzeitstabilität gewährleisten [28, 70, 102, 103, 104]. Da der *Sporolactobacillus inulinus* generell weniger anfällig gegenüber Substratinhibierung ist als der *Sporolactobacillus putidus* (siehe Kapitel 3.4.5, Seite 60 und Kapitel 3.4.6, Seite 62), wurde diese Spezies als geeigneter Kandidat ausgewählt. So hatte die Zellimmobilisierung mittels Lentikats® zum einen das Ziel, die Langzeitstabilität der durch Polyvinylalkohol geschützten Zellpopulation zu untersuchen, welche im Repeated-Batch getestet worden war. Des Weiteren sollten die Ergebnisse neben der Langzeitstabilität ebenfalls anhand von Parametern, wie der Produktivität, der Selektivität und Ausbeute über die Gesamtdauer bewertet werden.

Für die Untersuchung der Langzeitstabilität wurden Repeated-Batch-Experimente mit durchschnittlich 132,0 g/l Glucose im Erlenmeyerkolben durchgeführt. Dazu wurden 20,0 % Lentikats® (w/v) als Inokulum eingesetzt und die durchschnittliche Kultivierungszeit betrug 40 Stunden pro Batch. Die Ergebnisse der Experimente sind in der Abbildung 3.38 anhand der Glucose- und Produktkonzentration [g/l] gegen die Zeit in Stunden aufgetragen.

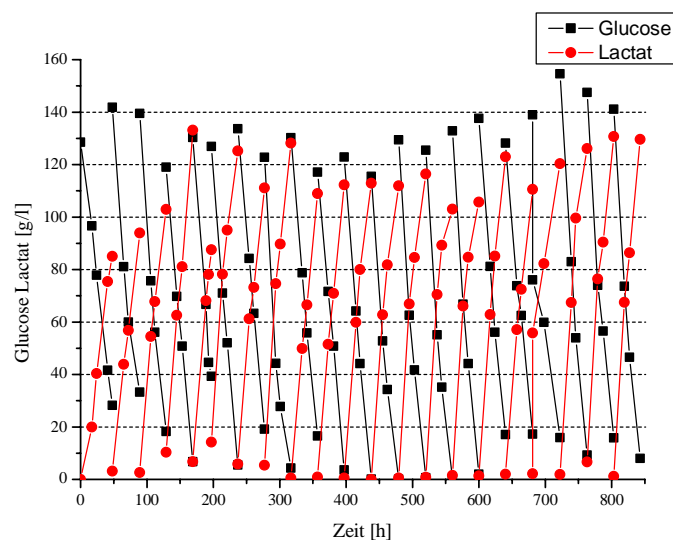


Abbildung 3.38: Repeated-Batch-Experimente mit 20,0 % Lentikats® (w/v) im GYP-Medium (100 ml Arbeitsvolumen) mit durchschnittlich 132,0 g/l Glucose bei 38 °C und 120 RPM. Neutralisationsmittel 60,0 g/l CaCO₃.

Die Abbildung verdeutlicht über die Gesamtdauer der Batches, dass die immobilisierten Zellen über eine Mindestdauer von 843 Stunden ohne Produktivitätsverlust repetitiv kultiviert werden können, da sich die Dauer der einzelnen Batches über die Zeit in Relation zu der Produktendkonzentration nicht

verlängert. Ferner wurden der absolute Glucoseverbrauch und die D-Lactatproduktion für die einzelnen Batches in der Abbildung 3.39 miteinander verglichen, um die Stabilitätsentwicklung der Zellimmobilisate anhand der Selektivität beschreiben zu können.

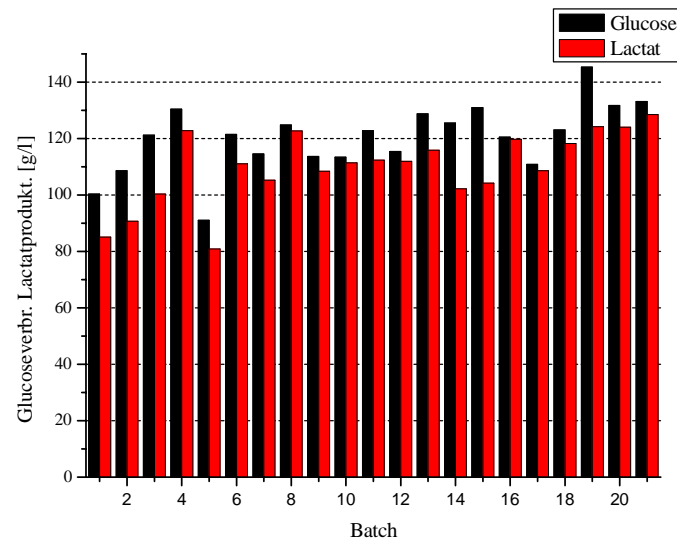


Abbildung 3.39: Darstellung des absoluten Glucoseverbrauchs und der Lactatproduktion für die einzelnen Batch-Experimente.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass der Glucoseverbrauch und somit die Produktkonzentration innerhalb der ersten drei Batches sukzessive ansteigt und sich die Werte ab dem Batch 4 stabilisieren. Die Steigerung der Werte kann mit der geringen Initialbeladung der Linsen von $5,8 \cdot 10^6$ Zellen/ mg Gel erklärt werden, da diese unter dem vom Hersteller empfohlenen Wert lag ($1,0 \cdot 10^7$ Zellen/ mg Gel). Daher könnte eine höhere Startbeladung zu einer schnelleren Stabilisierung der Repeated-Batch-Experimente führen.

Ferner kann ab Batch 4 eine durchschnittliche Selektivität von 95,0 % bis zum Ende der Experimente mit Batch 21 erreicht werden. An dieser Stelle ist anzumerken, dass Batch 5 im Gegensatz zu weiteren Ansätzen nur über eine Dauer von 28 Stunden durchgeführt worden ist, wodurch der niedrige Glucoseverbrauch bzw. die niedrige Produktkonzentration erklärt wird.

Nichtsdestotrotz kann ab dem Batch 16 eine weitere sukzessive Steigerung des Glucoseverbrauchs bzw. der Produktkonzentration beobachtet werden, was dadurch erklärt werden kann, dass die weitere Zugabe von 30,0 g/l CaCO_3 zur Pufferung schon ab 16 Stunden, anstatt, wie bei den Experimenten zuvor, erst nach 24 Stunden erfolgte (siehe Kapitel 2.5, Seite 29). Diese Handhabung hat womöglich zu einer effizienteren Pufferung geführt und kann somit die Steigerung der Werte erklären. Des Weiteren sollen die hier erzielten Ergebnisse anhand der Ausbeute, Selektivität, der Gesamtdauer und der Produktivität mit bereits publizierten Daten verglichen werden. Diese Parameter sind in der Tabelle 3.20 aufgelistet.

Tabelle 3.20: Vergleichsdaten verschiedener Fermentationsmethoden mit Zellimmobilisaten hinsichtlich der biotechnologischen Lactatproduktion.

Lactat-Isomer	Stamm	Methode	Ausbeute [%]	Selektivität [%]	Durschnittliche Produktivität [g/(L·h)]	Gesamtdauer in [h]	Quelle
D-Form	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> Y2-8	FFB/Repeated-Batch	97,9 ^A	97,9	1,62	450	[70]
D-Form	<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i> JCM2513	MFR/kontinuierlich	97,0 ^A	97,0	11,20	812	[102]
D-Form	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> QU 41	Membrantechnik/kontinuierlich	100,0	100,0	18,00	40	[103]
D-Form	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> DSM20348	Lentikats®/Repeated-Batch	89,0	95,0	2,96	843	Diese Arbeit
L-Form	<i>Bacillus coagulans</i> CCM4318	Lentikats®/Repeated-Batch			7,40	135	[104]

Die Angaben der Ausbeuten wurden hier zur einheitlichen Darstellung in Prozent wiedergegeben. ^A: Die Ausbeute wurde als Quotient des gebildeten D-Lactats und dem Gesamtzuckerumsatz berechnet.

Die Tabelle dokumentiert die bisher publizierten Daten bezüglich der D-Lactatproduktion mit Hilfe immobilisierter Zellen. Hinsichtlich der eingesetzten Immobilisierungstechniken wurden, neben Lentikats® (diese Arbeit), auch reaktorintegrierte Membranen, wie z. B. MFR (Membrane-Integrated Fermentation Reactor) oder FFB (Fibrous-Bed-Reactor) verwendet [70, 102]. Auffällig ist, dass die hier gezeigten Experimente die längste Gesamtdauer mit 843 h aufweisen, gefolgt vom Mimitsuka *et al.* (2012) mit 812 h, Zhao *et al.* (2014) mit 450 h, Rosenberg *et al.* (2005) mit 135 h und Tahsiro *et al.* (2011) mit 40 h [70, 103, 104]. Weiterhin auffällig sind die Werte der Gesamtproduktivität vom Mimitsuka *et al.* (2012) und Tashiro *et al.* (2011). Bei einer kontinuierlichen Methode sind die Produktabtrennung bzw. der Zustrom neuer Nährstoffe optimal auf die Bakterien abgestimmt. Somit sind die Produktivitätswerte deutlich höher als im Repeated-Batch und können nicht direkt miteinander verglichen werden [102, 103].

Direkt Vergleichbar sind allerdings die hier präsentierten Daten mit denen von Zhao *et al.* (2014) und Rosenberg *et al.* (2005), die ebenfalls mittels Repeated-Batch die Langzeitstabilität der Immobilisate getestet haben [70, 104]. Markant sind hier die deutlich unterschiedlichen Produktivitätswerte (siehe Tabelle 3.20). Diese Werte können mit der eingesetzten Menge an Hefeextrakt in den jeweiligen Experimenten in kausalen Zusammenhang gebracht werden. So wurden für die hier dargestellten Experimente jeweils 10,0 g/l verwendet, während Rosenberg *et al.* (2005) 15,0 g/l Hefeextrakt eingesetzt hat [104]. Hingegen hat Zhao *et al.* (2014) die Repeated-Batch-Experimente mit 5,0 g/l Hefeextrakt durchgeführt [70]. Dies lässt letztendlich den Schluss zu, dass die Gesamtproduktivität sehr

deutlich durch das Wachstum der Bakterien beeinflusst wird und die Menge an eingesetzten Stickstoff und essentiellen Wachstumsfaktoren den größten Einfluss haben. Wiederum stellen diese Komponenten auch den größten Kostenfaktor dar [63].

Schlussfolgerung: Anhand der Langzeitstabilität kann gezeigt werden, dass die Lentikat[®]-Immobilisate das Potential haben, Kosten für die Vorkultivierung in einem großtechnischen Prozess einzusparen. Des Weiteren konnte die Lag-Phase der Bakterien gänzlich eliminiert werden und konstante Werte bezüglich der Gesamtproduktivität sowie Selektivität über die Gesamtprozessdauer (843 h) erzielt werden. Infolgedessen könnte die Gesamtproduktivität der immobilisierten Zellen durch eine kontinuierliche Reaktionsführung gesteigert werden. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die Substrat- und Produktkonzentration auf einem unterkritischen Niveau gehalten werden. Dadurch werden negative Effekte, wie Produkt- und Substratinhibierung der Zellen minimiert [28]. Ein weiterer Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass auch die eingesetzte Menge der Stickstoffquelle reduziert werden kann. So konnte z.B. Mimitsuka *et al.* (2012) die Konzentration von Hefeextrakt von 10,0 auf 1,0 g/l im Laufe des Experiments reduzieren, wobei die Gesamtproduktivität bei 11,2 g/(L·h) lag [102]. Durch die Nutzung eines kostengünstigen Ersatzstoffes bei kontinuierlicher Reaktionsführung, könnten die Gesamtkosten für die D-Lactatproduktion somit noch einmal deutlich minimiert werden.

3.9 Quantitative Phosphatanalyse zur Bestimmung des Phosphatbedarfs hinsichtlich des

Sporolactobacillus inulinus im Bioreaktor

Mit Hilfe der Phosphatanalyse sollte aufgeklärt werden, wie hoch der Phosphatbedarf der Bakterienpopulation über den gesamten Kultivierungszeitraum ausfällt. Diese Informationen sollten darüber hinaus als Basis für die Kultivierung mit alternativen Rohstoffen dienen, die möglicherweise einen geringeren Phosphatgehalt aufweisen, um diesbezüglich eine Limitierung der D-Lactatproduktion durch Phosphatmangel zu vermeiden.

Für die Bestimmung des Phosphatgehalts (PO_4^{3-} im Hefeextrakt) wurde ein Batch-Experiment im Bioreaktor, mit 150,0 g/l Glucose und mit 60,0 g/l CaCO_3 als Neutralisationsmittel (4,0 % (v/v) Inokulum), über einen Zeitraum von 160 h angesetzt. Der Phosphatgehalt wurde zu den jeweiligen Probenahmepunkten photometrisch mittels Vanadat-Molybdat-Methode bei 435 nm bestimmt (siehe Kapitel 2.8.8, Seite 39). Des Weiteren wurde die Plausibilität der Messergebnisse anhand einer Standardaddition verifiziert und eine Wiederfindungsrate berechnet. Der Phosphatgehalt [mg/l] und die Wiederfindungsrate [%] sind für die Probenahmepunkte über den Kultivierungszeitraum in der Abbildung 3.40 dargestellt. Sie illustriert die Abnahme der Phosphatkonzentration über den Kultivierungszeitraum von 160 h für den *Sporolactobacillus inulinus*. Es ist zu erkennen, dass der Phosphatgehalt des Mediums innerhalb des Kultivierungszeitraums (0-160 h) insgesamt um 515,0 mg/l (von 636,0 auf 121,0 mg/l PO_4^{3-}) abnimmt.

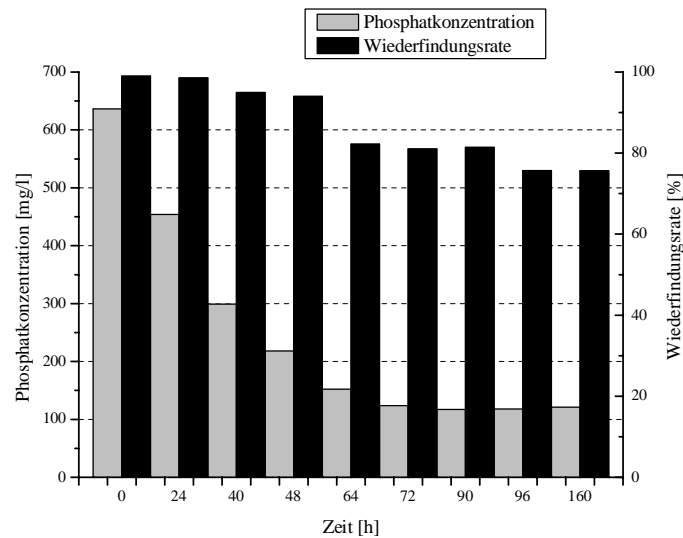


Abbildung 3.40: Zeitlich aufgelöste Phosphatbestimmung mit Hilfe der Vanadat-Molybdat-Methode bei 435 nm für den *Sporolactobacillus inulinus* im Bioreaktor, mit 150,0 g/l Glucose im GYP-Medium (Arbeitsvolumen 100 ml) bei 38 °C und 100 RPM. 4,0 % Inokulum (OD_{605} der Vorkultur von 0,4). Neutralisationsmittel: 60,0 g/l $CaCO_3$.

Darüber hinaus kann aus der Abbildung entnommen werden, dass sich die prozentuale Wiederfindungsrate durch die Standardaddition über die Gesamtprozessdauer von 99,0 % (0 h) auf 76,0 % (160 h) reduziert. Der Grund für die sukzessive Abnahme der Wiederfindungsrate kann möglicherweise durch die Zunahme der sich in Lösung befindlichen Calciumionen, im Zuge der $CaCO_3$ -Hydrolyse über die Gesamtprozessdauer erklärt werden. Wobei die Calciumionen einen Teil der Phosphationen komplexieren und diese nicht länger für die Inkorporation in den Vanadat-Molybdat-Komplex zur Verfügung stehen. Zusätzlich sind in der Tabelle 3.21 die Daten über die Ausbeute, die Produktendkonzentration und der maximalen OD_{605} , sowie der BTM-Bestimmung für dieses Experiment aufgelistet.

Tabelle 3.21: Daten hinsichtlich des Reaktorexperiments zur quantitativen Phosphatbestimmung.

D-Lactat [g/l] nach 160 h	Ausbeute [%]	Maximale OD_{605}	Biotrockenmasse [g/l]
129,1	87,3	7,62	2,83

Schlussfolgerung: Die Daten der Tabelle machen deutlich, dass ca. 500,0 mg/l Phosphat des Hefeextrakts benötigt werden, um eine Produktendkonzentration von 129,0 g/l zu erreichen. Zudem konnte in diesem Experiment eine maximale OD_{605} von 7,62 und ein entsprechendes BTM von 2,83 g/l ermittelt werden. Ein Vergleich der hier gewonnen Werte mit den Daten aus vorausgegangenen Experimenten zeigt, dass die Phosphatmenge in 10,0 g/l Hefeextrakt ausreicht, um deutliche höhere Werte bezüglich der Maximalen OD_{605} (siehe Tabelle 3.18, Seite 100) und der Biotrockenmasse (siehe Abbildung 3.2, Seite 44) zu erzielen. Ferner zeigt ein Vergleich mit den Ergebnissen zur

Reaktionsführung (siehe Kapitel 3.7.4.1, Seite 93), dass die eingesetzte Phosphatmenge (in 10,0 g/l Hefeextrakt) den Bedarf der Bakterien zum Umsatz von knapp 190,0 g/l Glucose abdecken kann und diesbezüglich eine Phosphatlimitierung ausgeschlossen werden kann.

3.10 D-Lactatproduktion auf der Basis agrarischer Reststoffe hinsichtlich des *Sporolactobacillus inulinus* im Bioreaktor

Ziel dieser Kultivierungsexperimente war es zum einen, die kostenintensive C-Quelle (p.a. Glucose) und N-Quelle (Hefeextrakt) durch agrarische Reststoffe zu ersetzen. Zum anderen sollte geprüft werden, ob es möglich ist, mit immobilisierten Zellen ein höher konzentriertes Neutralisationsmittel zu verwenden um die Produktendkonzentration zu steigern. Als C-Quelle ist der Zuckerrübensüßsaft (ZRDS) der Südzucker AG verwendet worden (siehe Kapitel 3.6.1, Seite 76), während als Stickstoffquelle ein Hydrolysat aus Rapsschrott (RS) eingesetzt worden ist [105]. Die eingesetzte Stoffmengenkonzentration des RS wurde auf den Stickstoffgehalt von 10,0 g/l Hefeextrakt (9,5 %) referenziert. Dementsprechend wurden die jeweiligen Experimente mit 21,2 g/l RS-Hydrolysat durchgeführt, um einen äquivalenten Stickstoffgehalt zum Hefeextrakt zu gewährleisten. Des Weiteren wurde den Nährstoffarmen RS als Komponenten noch 650,0 mg/l Phosphat (siehe Kapitel 3.9, Seite 105) und Vitamine hinzugefügt (siehe Tabelle 2.5, Seite 22), um eine Limitierung an essentiellen Wachstumsfaktoren zu vermeiden. Auf der Basis der Experimente zu den Salzen und Spurenelementen, wurde $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ als einziges Spurenelement dem Medium zugefügt (siehe Kapitel 3.4.8.2, Seite 69). Darüber hinaus wurde die initiale Zuckerkonzentration auf 180,0 g/l gesteigert, da der *Sporolactobacillus inulinus* eine hohe Substrattoleranz (siehe Kapitel 3.4.5, Seite 60) besitzt und der osmotische Druck auf die Zellen bei Saccharosesubstraten geringer ist (Siehe Kapitel 3.6.3, Seite 79). Ferner konnte aufgezeigt werden, dass Saccharose die bevorzugte Kohlenstoffquelle der Bakterien ist (siehe Kapitel 3.6.3, Seite 79).

3.10.1 D-Lactatproduktion auf der Basis agrarischer Reststoffe hinsichtlich des

***Sporolactobacillus inulinus* mit 6,8 M NH_3 -Lösung als Neutralisationsmittel**

Für die D-Lactatproduktion wurde hier als alternative C-Quelle Zuckerrübensüßsaft mit einer Saccharose-Startkonzentration von 178,9 g/l eingesetzt. Als Inokulum dienten 20,0 % (w/v) Lentikat®-Linsen. Als Neutralisationsmittel wurde 6,8 M (12,5 %) NH_3 -Lösung verwendet. Die Ergebnisse der Experimente sind in der Abbildung 3.41 anhand der Zucker und D-Lactatkonzentrationen [g/l] und des pH-Werts gegen die Zeit in Stunden [h] aufgetragen. Hieraus wird ersichtlich, dass die Konzentration der Saccharose innerhalb der ersten 10 h der Kultivierung auf von knapp 180,0 g/l auf 8,6 g/l sinkt. Darüber hinaus steigen die Konzentrationen von Glucose und Fructose innerhalb dieses Zeitraums auf

49,9 bzw. auf 11,9 g/l an, was darauf schließen lässt, dass die Saccharose zusätzlich, neben der Konvertierung zu D-Lactat, unter den Bedingungen durch das Neutralisationsmittel hydrolysiert wird.

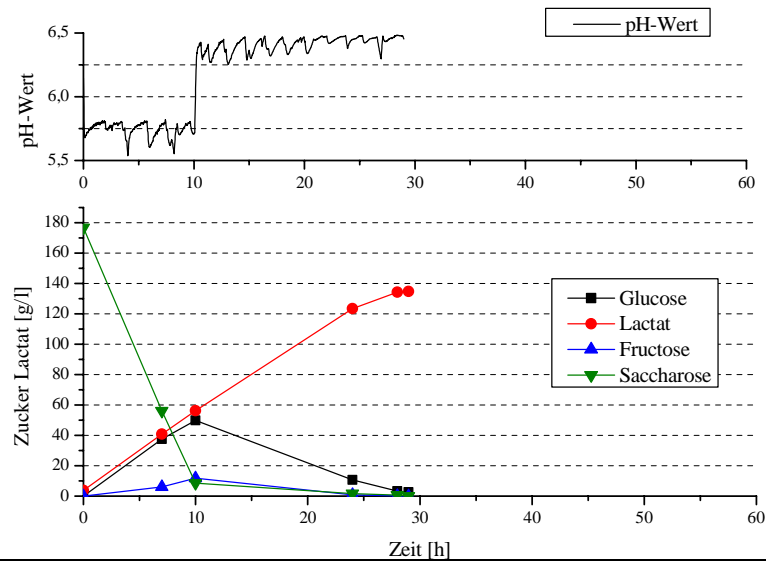


Abbildung 3.41: Kultivierungsexperiment (100 ml Arbeitsvolumen) mit ZRDS (178,9 g/l Saccharose) als Kohlenstoffquelle, RS-Hydrolysat (21,2 g/l) als Stickstoffquelle, 650,0 mg/l Phosphat, 2,0 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, supplementiert mit Vitaminen bei 38 °C und 250 RPM. Inokulum 20,0 % Lentikats® (w/v). pH-Sollwert 5,8. Neutralisationsmittel: 6,8 M $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. pH-Shift bei einer Produktkonzentration von 56,2 g/l.

Des Weiteren scheinen die Bakterien diesbezüglich eine Präferenz hinsichtlich der Fructose im Vergleich zur Glucose zu haben, da zu diesem Zeitpunkt die Glucosekonzentration um den Faktor 4,2 gegenüber der Fructose erhöht ist und man eine Konzentration von 1:1 bei gleichwertigen Abbau erwarten würde. Ferner wird nach 10 h eine D-Lactatkonzentration 56,2 g/l erreicht, wobei ab dieser Konzentration ein pH-Shift von pH 5,8 auf pH 6,5 durchgeführt wurde, um die Produktivität der Zellen bezüglich des D-Lactats zu erhöhen (siehe Kapitel 3.7.4.4, Seite 99). Nach 24 Stunden Kultivierungsdauer beträgt die Restzucker-Konzentration noch 13,1 g/l und es wird eine D-Lactatkonzentration von 123,5 g/l erreicht. Letztendlich ist das Experiment bei vollständigen Substratverbrauch nach 29 h beendet und es konnte eine finale Konzentration von 134,8 g/l D-Lactat gemessen werden. Des Weiteren sind die Ausbeutewerte, Produktendkonzentration, die Produktivität, die Summe der Nebenprodukte und der Verbrauch an Neutralisationsmittel in der Tabelle 3.22 dargestellt.

Tabelle 3.22: Ergebnisdaten des Kultivierungsexperiments mit ZRDS und RS bezüglich der Zellimmobilisate mit 6,8 M $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ als Neutralisationsmittel.

D-Lactat [g/l] nach 29 h	Ausbeute [%]	Selektivität [%]	Gesamtproduktivität [g/(l·h)]	Nebenprodukte [g/l] nach 29 h	Titrationsvolumen NH_3 [ml]
134,8	93,8	98,6	4,65	1,3	31,3

Die Daten in der Tabelle veranschaulichen, dass es innerhalb von 29 Stunden möglich ist, 134,8 g/l D-Lactat mit einer Ausbeute von 93,8 % und einer Produktivität von 4,65 g/(L·h) auf der Basis agrarische Reststoffe zu produzieren. In einem Folgeexperiment sollte geprüft werden, ob es realisierbar ist, ein höher konzentriertes Neutralisationsmittel einzusetzen, um die Produktendkonzentration zu steigern und somit den Downstream-Prozess hinsichtlich der Produktaufreinigung kostengünstiger zu machen.

3.10.2 D-Lactatproduktion auf der Basis agrarischer Reststoffe hinsichtlich des *Sporolactobacillus inulinus* mit 13,4 M NH_3 -Lösung als Neutralisationsmittel

Einheitlich zu den vorangegangenen Experimenten wurden Rapsschrott-Hydrolysat und Zuckerrübenschnitzsaft als Substrate eingesetzt. Die Zucker-Startkonzentration betrug hier 183,8 g/l und als Neutralisationsmittel diente eine 13,4 M (25,0 %) NH_3 -Lösung. Als Inokulum wurden ebenfalls 20,0 % (w/v) Lentikat®-Linsen gewählt. Die Resultate dieser Experimente sind in der Abbildung 3.42 dargestellt.

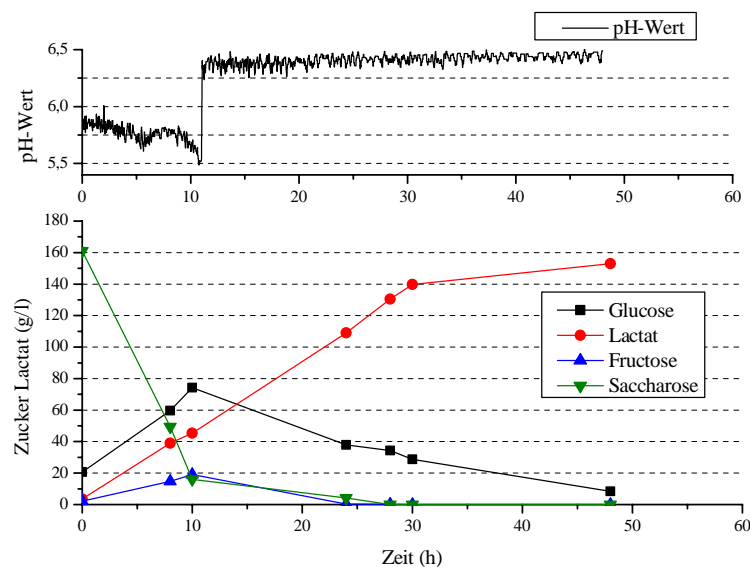


Abbildung 3.42: Kultivierungsexperiment (100 ml Arbeitsvolumen) mit ZRDS (183,8 g/l Zucker) als Kohlenstoffquelle, RS-Hydrolysat (21,2 g/l) als Stickstoffquelle, 650,0 mg/l Phosphat, 1,0 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, supplementiert mit Vitaminen bei 38 °C und 250 RPM. Inokulum 20 % Lentikats® (w/v). pH-Sollwert 5,8. Neutralisationsmittel: 13,4 M $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. pH-Shift bei einer Produktkonzentration von ca. 50,0 g/l.

Die Abbildung zeigt den Kultivierungsverlauf anhand der Zucker- und D-Lactatkonzentration sowie den pH-Verlauf über die Zeit. Auch hier ist im Kurvenverlauf eine abnehmende Saccharose-Konzentration auf 16,1 g/l innerhalb der ersten 10 Stunden zu erkennen. Ebenfalls zu sehen ist, dass die Konzentrationen der Monosaccharide Fructose und Glucose innerhalb dieser Zeit auf 19,1 g/l bzw. auf 74,8 g/l ansteigen und eine D-Lactatkonzentration von 45,3 g/l erzielt wird. Die ungleich steigenden Konzentrationen der Monosaccharide bestätigen die Substratpräferenz der Bakterien bezüglich der Fructose (gegenüber Glucose) aus dem vorausgegangen Experiment.

Darüber hinaus wurde bei einer D-Lactatkonzentration von ca. 50,0 g/l ebenfalls ein pH-Shift auf 6,5 durchgeführt um eine Inhibition durch die nicht-dissoziierte Säure der Zellen bei höheren Produktkonzentrationen zu vermeiden. Im Gegensatz zu dem vorigen Experiment, wurde hier das Substrat erst nach 48 h nahezu verbraucht, was möglicherweise daran liegt, dass freie Zellen durch die oxidativen Bedingungen abgetötet worden sind und somit die gesamte D-Lactatproduktion durch die Gelmatrix geschützten Zellen realisiert wurde. Vorhergehende Kultivierungsexperimente mit freien Zellen und konzentrierter Base (13,4 M $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) führten zu keinem Wachstum. Dennoch konnte eine durchschnittliche D-Lactatendkonzentration von 153,0 g/l gemessen werden, was einer Steigerung von 18,2 g/l oder 11,9 % zum vorherigen Experiment entspricht. Ferner sind die Werte für die Ausbeute, der Produktivität und die Summe der Nebenprodukte in der Tabelle 3.23 dargestellt.

Tabelle 3.23: Ergebnisdaten des Kultivierungsexperiments mit ZRDS und RS bezüglich der Zellimmobilisate mit 13,4 M $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ als Neutralisationsmittel.

D-Lactat [g/l] nach 48 h	Ausbeute [%]	Selektivität [%]	Gesamtproduktivität [g/(l·h)]	Nebenprodukte [g/l] nach 48 h	Titrationvolumen NH_3 [ml]
153,0	91,1	95,4	3,29	1,4	-

Die Werte der Tabelle zeigen, dass D-Lactat auch mit konzentrierter Base auf der Basis von agrarischen Reststoffen, mit hoher Selektivität, in hoher Konzentration und Ausbeute, biotechnologisch produziert werden kann. Für die Berechnung der prozentualen Ausbeute wurde das Titrationvolumen aus dem vorausgegangen Experiment hinzugezogen und auf den tatsächlich zu D-Lactat konvertierten Zucker relativiert. Da hier die doppelte Molarität der Base eingesetzt wurde, wurde der Wert letztlich durch den Faktor 2 dividiert. Zusätzlich wurde bei diesem Experiment die optische Reinheit des Produktes über die Kultivierungszeit bestimmt. Die Ergebnisse der Messungen sind in der Tabelle 3.24 zusammengestellt.

Tabelle 3.24: Probenahmezeitpunkte mit der dazugehörigen D-Lactatkonzentration und dessen Enantiomerenüberschuss (ee) in Prozent.

Probennahme [h]	Lactat [g/l]	Enantiomerenüberschuss (ee) D-Lactat [%]
8	38,9	$\geq 99,0$
10	45,3	$\geq 99,0$
24	105,4	$\geq 99,0$
28	126,8	$\geq 99,0$
30	136,2	$\geq 99,0$
48	153,0	$\geq 99,0$

Die Daten hinsichtlich der chiralen Messungen zeigen auf, dass die Biokatalyse zu Lactat (siehe Kapitel 1.3.3, Seite 9), ausschließlich über eine D-Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.28) zu jedem Zeitpunkt der Kultivierung erfolgt, da keine quantifizierbaren Signale bezüglich des L-Lactat-Isomers bei der chiralen Messung verifiziert werden konnten (siehe Abbildung 5.31 im Anhang, Seite 131).

Schlussfolgerung: Ein Vergleich beider Experimente zeigt, dass es möglich ist, durch eine höhere Neutralisationsmittelkonzentration eine höhere Produktkonzentration (11,9 %) zu erreichen. Obgleich die Gesamtproduktivität bei der Neutralisation mit hochkonzentrierter Base um 1,36 g/(l·h) zurückging. Die Ursache dafür könnte möglicherweise die Toxizität der konzentrierten NH_3 -Lösung auf die Zellen sein. Kultivierungsexperimente mit konzentrierter Ammoniaklösung und freien Zellen führten zu keinem Wachstum und somit zu keiner D-Lactatproduktion. Dadurch wurde die gesamte D-Lactat-Biosynthese wahrscheinlich durch die Gelmatrix geschützten Zellen realisiert. Die Toxizität bezüglich der freien Zellen hätte aber für eine kontinuierliche Reaktionsführung den Vorteil, dass zum einen das Problem des Membran-Fouling minimiert werden könnte. Zusätzlich würde das Kontaminationsrisiko durch Fremdkörper reduziert werden würde. Ferner hätte eine kontinuierliche Applikation den weiteren Vorteil, dass die Produktinhibierung der Zellen minimiert werden könnte, was letztendlich die Gesamtproduktivität steigern würde.

Darüber hinaus sollen die gezeigten Ergebnisse mit den Literaturbekannten Daten zur D-Lactatproduktion auf Basis agrarischer Reststoffe verglichen und diskutiert werden, um den Stellenwert der Erkenntnisse objektiv einordnen zu können. Wichtige Vergleichsparameter für einen kostengünstigen, industriell anwendbaren Prozess, wie die Produktivität, die optische Reinheit, Ausbeute und die Prozessdauer sind in der Tabelle 3.25 zusammengefasst.

Die aktuellste Arbeit hinsichtlich der D-Lactatproduktion mittels agrarischen Reststoffen wurde von Tadi *et al.* (2015) publiziert (siehe Tabelle 3.25, Nr. 1) Hier wurden Palmenrohrzucker (PJ) und ein Weizenproteinhydrolysat als Substrate in einem Batch-SHF-Prozess eingesetzt, wobei eine Produktendkonzentration von 189,0 g/l, mit einer Gesamtproduktivität von 5,25 g/(l·h) erzielt werden konnte. Ungeachtet der hohen Produktkonzentration und Gesamtproduktivität, ist dieser Prozess mit CaCO_3 durchgeführt worden. Somit könnten zusätzliche Kosten für einen industriellen Prozess durch die Entsorgung des anfallenden Gips-Nebenprodukts und den hohen Bedarf an H_2SO_4 entstehen. Im Gegensatz dazu konnten die Experimente (siehe Tabelle 3.25, Nr. 7 und Nr. 8) in dieser Arbeit aufzeigen, dass D-Lactat auch mit $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in hoher Konzentration und mit hoher Produktivität biotechnisch hergestellt werden kann. Auch wenn die Werte durch die Verdünnung etwas niedriger ausfallen, so ist die erreichte Stoffmengenkonzentration (Durchschnitt beider Experimente) mit jeweils 1,86 M D-Lactat, mit der von Tadi *et al.* (2015) erzielten Stoffmengenkonzentration von 2,1 M D-Lactat vergleichbar [71].

Tabelle 3.25: Auflistung der Publikationen zur biotechnologischen D-Lactatproduktion auf der Basis agrarischer Reststoffe.

Nr.	Stamm	Substrate C-/N-Quellen	Neutralisations Mittel	Reaktions- Führung	D-Lactat [g/l]	Produktivität [g/(l·h)]	Prozess- Dauer in [h]	Ausbeute [%]	Optische Reinheit [%]	Quelle
1	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> NBRC 13595	Palmenrohrzucker / Weizenprotein-hydrolysat (11,99 g/l)	CaCO ₃ (kontinuierliche Dosierung)	Batch-SHF	189,0	5,25	36	94,0	>98,0	[71]
2.	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> Y2-8	Maisstärke-Hydrolysat und HE (5g/l)	NH ₃ H ₂ O (6,0 M)	Fed-Batch-SHF-FBB	218,8	1,62	132	98,0 ^A	99,0	[70]
3.	<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i> DSM442	Glucose und Baumwollsaamen-Hydrolysat (40g/l)	CaCO ₃ (kontinuierliche Dosierung)	Fed-Batch-SSF	144,4	4,13	35	96,0	99,3	[69]
4.	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> CASD	Glucose/ Erdnussmehl (40 g/l)	CaCO ₃ (kontinuierliche Dosierung)	Fed-Batch-SSF	207,0	3,80	54	93,0 ^A	99,3	[68]
5.	<i>Lactobacillus coryniformis</i> ATCC 25600	Kurkuma/ Sojabohnen-mehl (30 g/l)	NH ₃ H ₂ O (14,8 M)	Batch-SSF	91,6	2,08	44	65,4	99,5	[64]
6.	<i>Lactobacillus coryniformis</i> ATCC 25600	Süßkartoffel-Wurzeln/ HE (7 g/l) / Pepton (3 g/l)	NH ₃ H ₂ O (14,8 M)	Batch-SSF	186,4	3,11	60	85,0	-	[65]
7.	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> DSM 20348	ZRDS/ RS (21,1 g/l)	NH ₃ H ₂ O (6,8 M)	Batch-SHF-Lentikats®	134,8	4,65	29	93,8	-	Diese Arbeit
8.	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> DSM 20348	ZRDS/ RS (21,1 g/l)	NH ₃ H ₂ O (13,4 M)	Batch-SHF-Lentikats®	153,0	3,29	48	91,1	≥99,0	Diese Arbeit

Die Angaben der Ausbeuten wurden hier zur einheitlichen Darstellung in Prozent wiedergegeben. ^A: Die Ausbeute wurde als Quotient des gebildeten D-Lactats und dem Gesamtzuckerumsatz berechnet.

Des Weiteren wurde in der Publikation von Zhao *et al.* (2014) (siehe Tabelle 3.25, Nr. 2) 250,0 g/l enzymatisch hydrolysierte Maisstärke als C-Quelle für den *Sporolactobacillus inulinus* Y2-8 im Fed-Batch getestet, wobei die bisher höchste publizierte D-Lactatendkonzentration von 218,8 g/l erreicht werden konnte. Jedoch fällt bei näherer Betrachtung der Daten auf, dass keine Verdünnungswerte bezüglich des Neutralisationsmittels (6,0 M $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) berücksichtigt wurden und die somit erzielte Produktendkonzentration in Relation zur eingesetzten Substratmenge physikalisch nicht zu realisieren ist, was möglicherweise auf Verdunstungseffekte während des Prozesses und/ oder einen Berechnungsfehler hindeutet. Im Vergleich zu den Literaturdaten, konnte hier mit einer 6,8 molarer Ammoniaklösung als Neutralisationsmittel eine Produktendkonzentration von 134,8 g/l D-Lactat erzielt werden, wobei die absolute Verdünnung ca. 31,0 % betrug (siehe Tabelle 3.25 Nr. 7). Darüber hinaus ist die Produktivität des *Sporolactobacillus inulinus* Y2-8 mit 1,62 g/(l·h) im Vergleich zu den weiteren publizierten Werten in der Tabelle 3.25 relativ gering bzw. die Prozessdauer mit 132 Stunden relativ hoch.

Im Gegensatz dazu konnte Li *et al.* (2013) mit den Substraten Glucose sowie einem Baumwollsamenshydrolysat mit Hilfe des *Sporolactobacillus laevolacticus* DSM442 deutlich bessere Werte erzielen. So betrug die Kultivierungszeit (siehe Tabelle 3.25, Nr. 3) nur 35 Stunden und die Produktivität ist in Relation zu den anderen Publikationen, mit 4,13 g/(l·h) einer der höchsten Werte bezüglich der D-Lactatproduktion mit agrarischen Reststoffen. Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass dieses Experiment mit einem Inokulum von 20,0 % (einer 48 h Vorkultur) durchgeführt wurde, welches im industriellen Maßstab einen hohen Kostenfaktor darstellen würde. Im Unterschied dazu kann auf die Vorkultur mit Lentikats[®]-Immobilisaten gänzlich verzichtet werden. Zudem weisen die PVA-Linsen eine hohe Langzeitstabilität auf (Siehe Kapitel 3.8, Seite 102).

Weiterhin hervorzuheben ist die Arbeit von Wang *et al.* (siehe Tabelle 3.25, Nr. 4), in der eine relativ hohe Produktendkonzentration (207,0 g/l) und Ausbeute (93,0 %) mit einer Produktivität von 3,80 g/(l·h) realisiert werden konnte. Nichtsdestotrotz wäre das eingesetzte Erdnussmehl-Hydrolysat aufgrund der Rohstoffkosten großtechnisch nicht bezahlbar [62].

Darüber hinaus konnte Nguyen *et al.* (2013) aufzeigen (siehe Tabelle 3.25, Nr. 5 und 6), dass es möglich ist, mit Hydrolysaten aus Kurkuma und Süßkartoffelwurzeln, D-Lactat in hoher Konzentration (186,4 g/l) herzustellen. Das Problem hierbei war, dass die Ausbeute (65,4 %) mit Sojabohnenmehl als Stickstoffquelle sehr gering ausfiel. Daher mussten für höhere Produktausbeuten (85,0 %) teure Stickstoffquellen (Hefeextrakt und Pepton) verwendet werden.

4 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

4.1 Zusammenfassende Diskussion

In dieser Arbeit wurden die beiden D-Lactat produzierende Stämme *Sporolactobacillus inulinus* DSM 20348 und *Sporolactobacillus putidus* DSM 21265 auf ihre Eignung für eine industrielle Anwendung für die biotechnologische D-Lactatproduktion eingehend untersucht. Dazu wurde zunächst der Zusammenhang zwischen dem bakteriellen Wachstum und der D-Lactat-Synthese betrachtet. Es konnte für den *Sporolactobacillus inulinus* festgestellt werden, dass die D-Lactatproduktion mit der Zunahme der Biomasse im kausalen Zusammenhang steht. Hingegen neigt der *Sporolactobacillus putidus* zur Zellaggregation, wodurch dieser Zusammenhang nur für den Übergang in die exponentielle Phase bestimmt werden konnte. Experimente zur Inkubationstemperatur zeigten für beide Spezies ein Optimum bei 39 °C, wenngleich der Optimalbereich nur ± 2 °C betrug. Für alle weiteren Experimente wurde deshalb eine Temperatur von 38 °C angewendet.

Weiterführend wurden die Einflüsse der einzelnen Medienkomponenten des DSMZ-Mediums (Glucose-Yeast-Peptide, GYP) 852 auf das Wachstum bzw. die Produktivität der Bakterien ermittelt. Hier konnte bestimmt werden, dass beide Stämme präferentiell Hefeextrakt (HE) besser nutzen können als die Stickstoffquellen Trypton und/ oder Pepton/Trypton. Zusätzlich konnte für den *S. inulinus* eine optimale HE-Konzentration von 20,0 g/l ermittelt werden, wobei die Optimalkonzentration für den *S. putidus* bei 10,0 g/l lag. Dennoch wurde aufgrund des Kostenfaktors (für HE) in den folgenden Experimenten mit 10,0 g/l HE als Standardkonzentration gearbeitet. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass das im Medium enthaltende MgSO_4 gering (*S. inulinus*) oder negativ (*S. putidus*) zur D-Lactatproduktion der Biokatalysatoren beiträgt und die Spurenelemente eine essentielle Bedeutung für bakteriellen Stoffwechsel haben. Bei weitergehenden Analysen hinsichtlich des *Sporolactobacillus inulinus* konnte aufgezeigt werden, dass 1,0-2,0 mM Eisen(II)-sulfat, die im Medium enthaltenden Salze und Spurenelemente, bei einer Steigerung der maximalen Produktivität um 0,73 g/(l·h), komplett ersetzen kann. Weitere Untersuchungen ergaben, dass der maximale Glucoseverbrauch mit 2,0 g/l NaOAc bezüglich beider Stämme gesteigert werden kann, wenn auch die Selektivität dadurch nicht erhöht werden konnte. Experimente zur Zuckerstartkonzentration zeigten, dass die besten Resultate hinsichtlich der Ausbeute, Produktkonzentration und der Lag-Phase für den *Sporolactobacillus inulinus* bei 150,0 g/l Glucose erzielt werden konnten, indes die Optimalkonzentration für den *Sporolactobacillus putidus* zwischen 120,0 - 130,0 g/l Glucose lag. Außerdem konnten diese Experimente belegen, dass der *Sporolactobacillus inulinus* eine höhere Toleranz entgegen einer hohen initialen Zuckerkonzentration (bis 270,0 g/l Glucose) aufweist. Demgegenüber wird *Sporolactobacillus putidus* bei Konzentrationen ab 200,0 g/l Glucose vollständig in der D-Lactatproduktion gehemmt.

Zusätzlich ergaben die Untersuchungen zur Nutzbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen, dass beide

Spezies eine Vielzahl von Hexosen und Disacchariden metabolisieren, obgleich Pentosen nicht zur D-Lactat-Konversion genutzt werden können. Anhand dieser Erkenntnisse konnte Zuckerrübenschnitzsaft (ZRDS) als potentielle alternative Kohlenstoffquelle experimentell ermittelt werden. Anschließende Studien hinsichtlich des Zuckermetabolismus des *Sporolactobacillus inulinus* zeigten auf, dass aufgrund der Anpassung an eine pflanzliche Umgebung, Saccharose die bevorzugte Kohlenstoffquelle der Bakterien ist.

Studien zur Untersuchung des pH-Werts mit $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ als Neutralisationsmittel zeigten einen Optimalwert für den *Sporolactobacillus inulinus* bei pH 5,8, während der *Sporolactobacillus putidus* ein Optimum bei pH 5,2 besitzt. Darüber hinaus schien das Neutralisationsmittel zur Kultivierung des *Sporolactobacillus putidus* ungeeignet zu sein, da im Vergleich zum *Sporolactobacillus inulinus* nur Ausbeuten von 57,0 % erreicht werden konnten. Daher wurden die folgenden Experimente zur Prozessoptimierung mit CaCO_3 und $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ als Neutralisationsmittel, angesichts der besseren Handhabbarkeit, nur für den *Sporolactobacillus inulinus* durchgeführt. Die Experimente mit CaCO_3 als Neutralisationsmittel wurden mittels Fed-Batch-Methode im Bioreaktor realisiert. Weiterhin wurden die Experimente mit 10 % Inokulum (OD_{605} der Vorkultur 2,0) und 75,0 g/l CaCO_3 sowie einer Rührung von 750 RPM prozessiert. So konnten in 50 h 137,8 g/l D-Lactat mit einer Ausbeute von 94,9 % und einer Gesamtproduktivität von 2,82 g/(l·h) hergestellt werden. Andererseits wiesen die Untersuchung mit $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ als Neutralisationsmittel eine sukzessive Produkthemmung der Bakterien durch nicht-dissoziierte Milchsäure (HLA) auf. Diese Inhibierung konnte durch einen konzentrationsabhängigen pH-Shift bei ca. 60,0 g/l D-Lactat umgangen werden. Des Weiteren konnte die Lag-Phase der Zellen mit Hilfe von Lentikat®-Immobilisaten eliminiert werden. Im Repeated-Batch konnte eine Langzeitstabilität der Immobilisate von (mindest.) 843 h nachgewiesen werden. Über diesen Zeitraum konnte D-Lactat mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 89,0 %, einer Gesamtproduktivität von 2,96 g/(l·h) und einer Selektivität von 95,0 % produziert werden.

Letztendlich konnte durch die Kombination dieser gewonnenen Erkenntnisse nachgewiesen werden, dass es biotechnisch möglich ist, D-Lactat in hoher Konzentration (153,0 g/l mit 13,4 M $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ als Neutralisationsmittel), einer hohen Gesamtproduktivität von 3,29 g/(l·h) und mit hoher optischer Reinheit ($\geq 99,9$ %) auf der Basis von agrarischen Reststoffen, wie Zuckerrübenschnitzsaft (ZRDS) und Rapsschrothydrolysat (RS), herzustellen.

4.2 Ausblick

Die Kultivierungsergebnisse auf der Basis von agrarischen Reststoffen unter Zuhilfenahme von Lentikats®-Immobilisaten mit $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ als Neutralisationsmittel präsentieren vielsprechende Werte hinsichtlich der Gesamtproduktivität, der Ausbeute, Produktkonzentration und der Langzeitstabilität. Jedoch musste im Batch-SHF-Prozess ein konzentrationsabhängiger pH-Shift zwischen 50,0 - 60,0 g/l

D-Lactat durchgeführt werden, um eine Produkthemmung seitens des Biokatalysators durch den einhergehenden Konzentrationsanstieg von nicht-dissoziierter Milchsäure (HLA) entgegenzuwirken. Dieses Problem könnte durch eine kontinuierliche Reaktionsführung gelöst werden. Mit einer ständigen Produktabtrennung kann das Problem der Produkthemmung auf ein Minimum reduziert werden und dadurch könnte der Optimal-pH-Wert für die maximale Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien aufrechterhalten werden. Obgleich die Gesamtproduktivität bei der Neutralisation mit konzentrierter Base (13,4 M) um 1,36 g/(l·h) zurückging (siehe Tabelle 3.25, Nr. 7 und 8, Seite 112), hat die Toxizität der Base auf freien Zellen möglicherweise den Vorteil, dass zum einen das Problem des Membran-Fouling minimiert werden könnte und zusätzlich das Kontaminationsrisiko durch Fremdkeime reduziert werden würde.

Zudem kann mit der Zufuhr neuer Nährstoffe bei kontinuierlicher Reaktionsführung die Gesamtproduktivität erhöht werden und möglicherweise kann auch die Konzentration der Stickstoffquelle und der essentiellen Wachstumsfaktoren, wie z.B. Vitamine, erheblich reduziert werden, sodass die Produktionsgesamtkosten trotz Ersatzstoffe womöglich noch weiter gesenkt werden könnten [102].

5 Anhang

5.1 Anhang: Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf das Wachstum des *Sporolactobacillus* Spezies

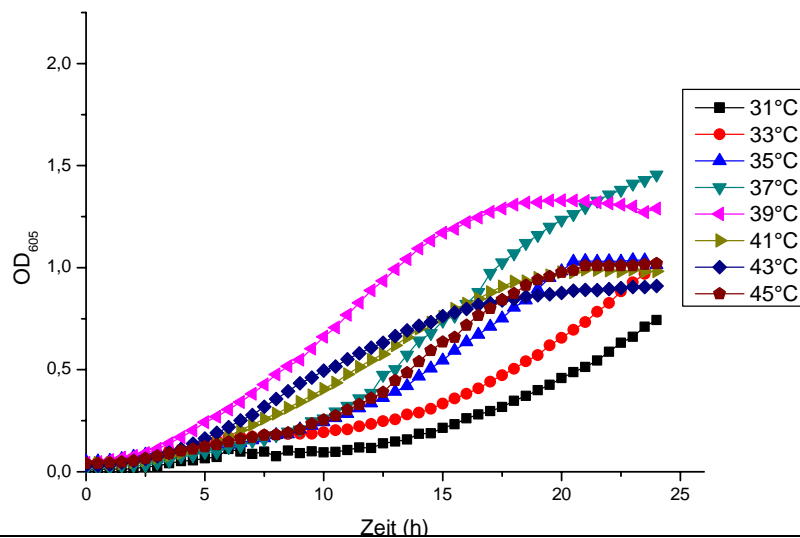


Abbildung 5.1: Einfluss der Temperatur auf das Wachstum des *Sporolactobacillus inulinus*

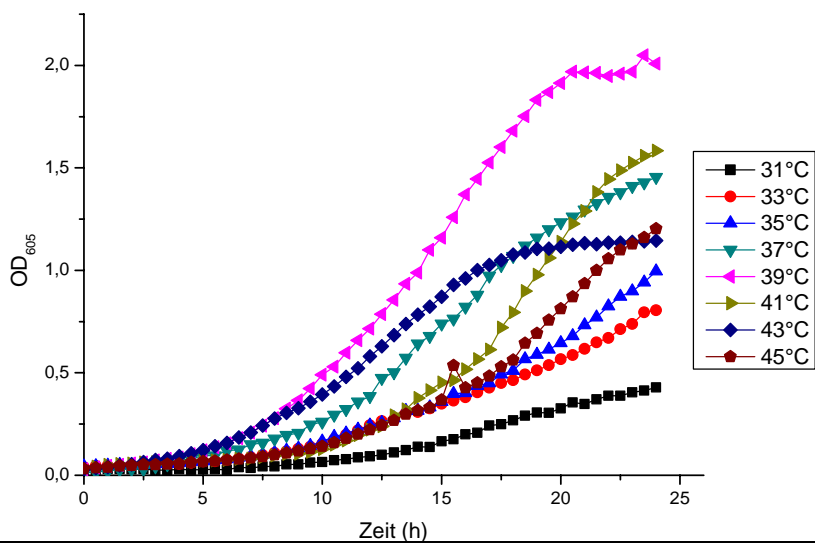


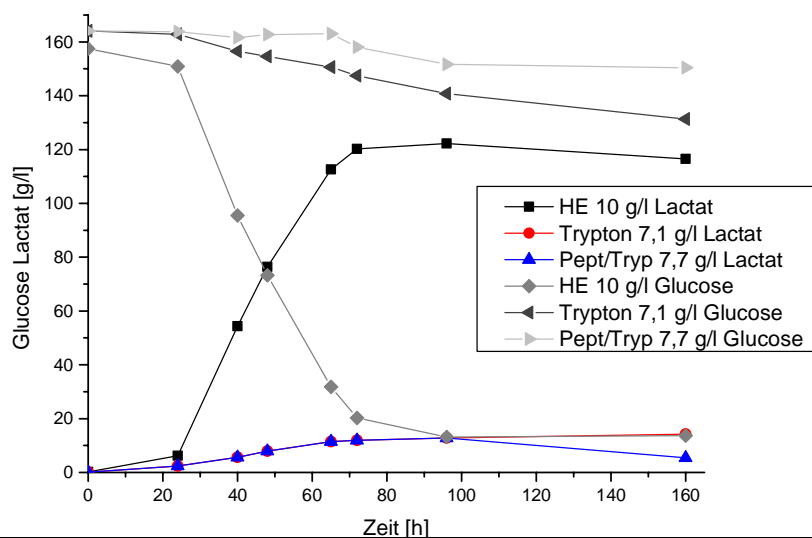
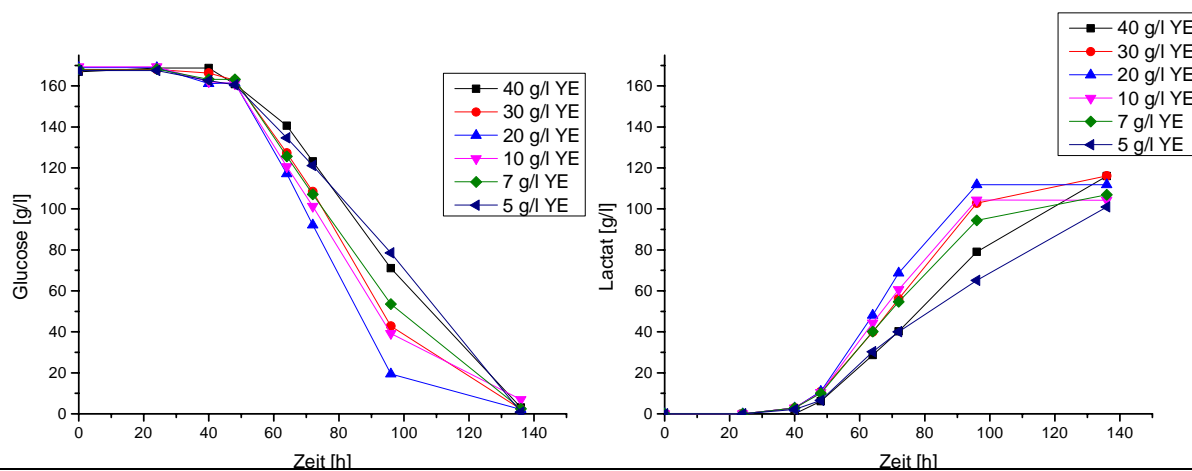
Abbildung 5.2: Einfluss der Temperatur auf das Wachstum des *Sporolactobacillus putidus*

5.2 Anhang: Zusammensetzung DSMZ-Medium 852 (Glucose-Yeast-Peptone, GYP-Medium)

Tabelle 5.1: DSMZ-Medium 852 (GYP-Medium).

Ingredients	g/l	Salt solution:	g/l
Glucose	20	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	40
Yeast extract	10	MnSO ₄ x 4 H ₂ O	2
Peptone (tryptic)	10	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2
Na-acetate	10	NaCl	2
Salt solution	5		
Distilled water	1000 ml	Distilled water	1000 ml

5.3 Anhang: Variation der Stickstoffquellen und der Hefeextraktkonzentration für den *Sporolactobacillus inulinus*

Abbildung 5.3: Variation der Stickstoffquellen für den *Sporolactobacillus inulinus*.Abbildung 5.4: Variation der Hefeextraktkonzentration für den *Sporolactobacillus inulinus*.

5.4 Anhang: Variation der Stickstoffquellen und der Hefeextraktkonzentration für den *Sporolactobacillus putidus*

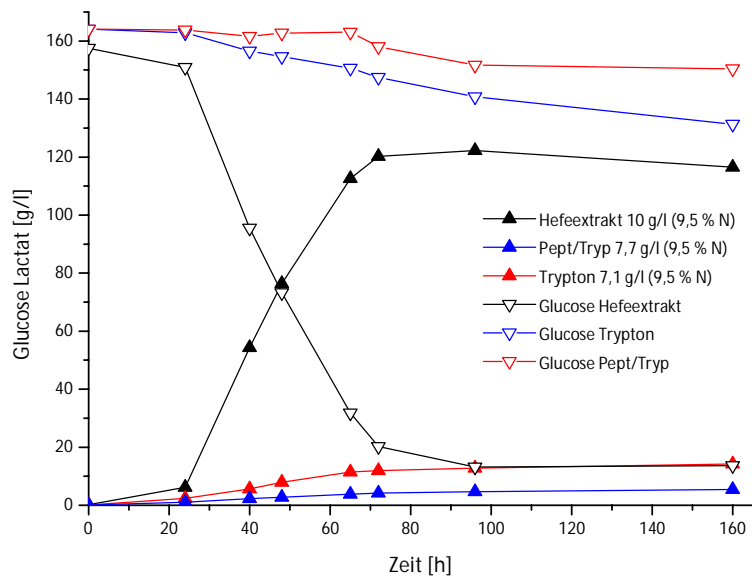


Abbildung 5.5: Variation der Stickstoffquellen für den *Sporolactobacillus putidus*.

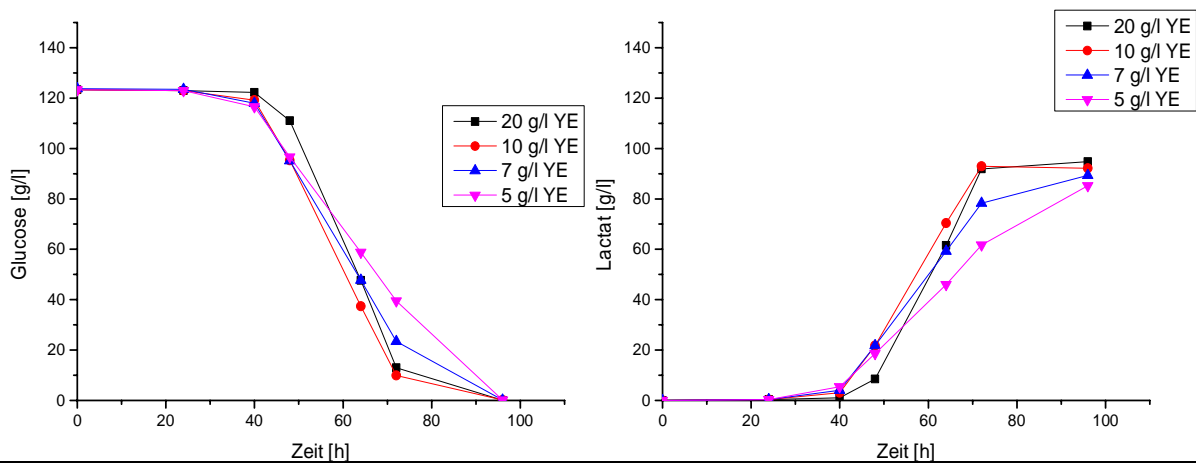


Abbildung 5.6: Variation der Hefeextraktkonzentration für den *Sporolactobacillus putidus*.

5.5 Anhang: Untersuchung der Glucosestartkonzentrationen für den *Sporolactobacillus inulinus*

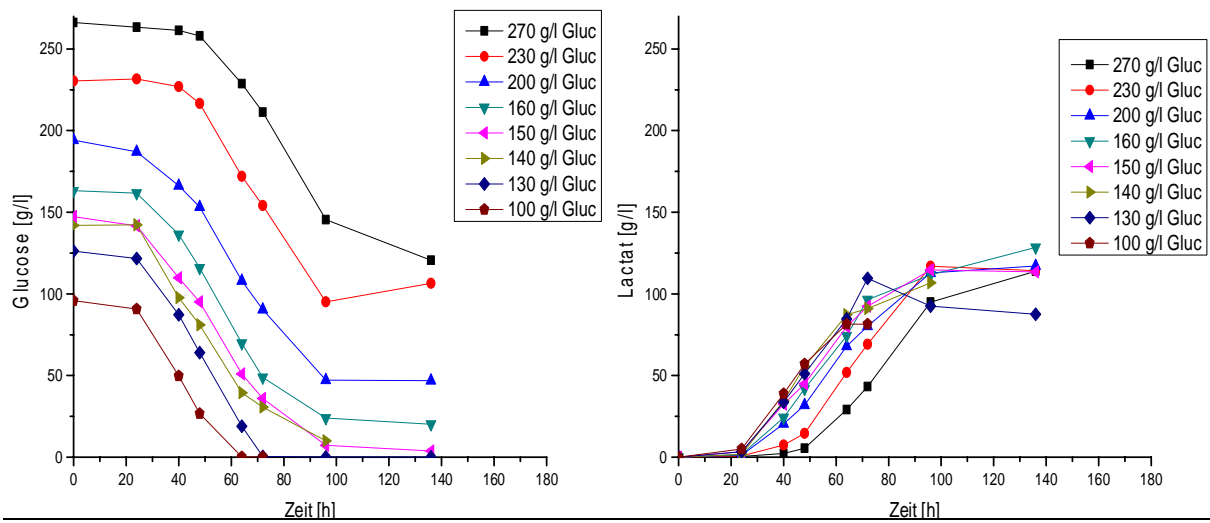


Abbildung 5.7: Variation der Glucosestartkonzentration für den *Sporolactobacillus inulinus*.

5.6 Anhang: Untersuchung der Glucosestartkonzentrationen für den *Sporolactobacillus putidus*

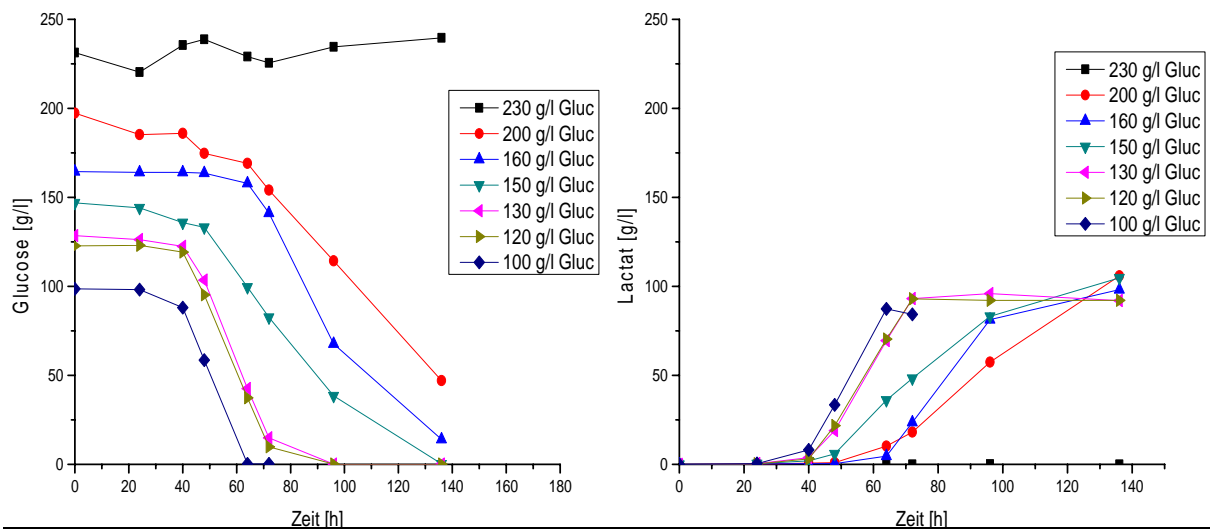


Abbildung 5.8: Variation der Glucosestartkonzentration für den *Sporolactobacillus putidus*.

5.7 Anhang: Einfluss von Natriumacetat auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus*

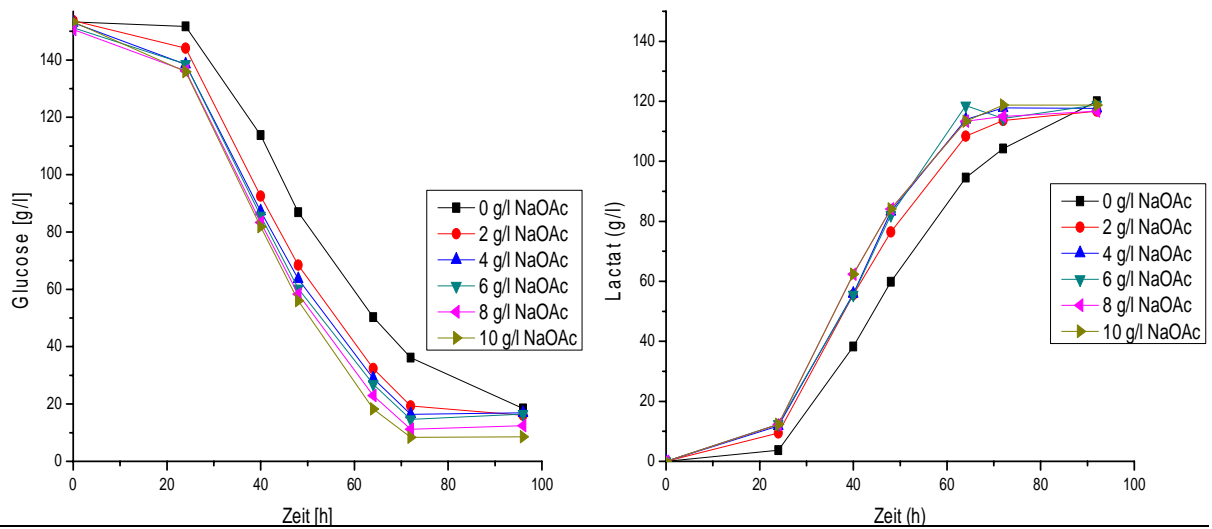


Abbildung 5.9: Variation der NaOAc-Konzentration für den *Sporolactobacillus inulinus*.

5.8 Anhang: Einfluss von Natriumacetat auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus putidus*

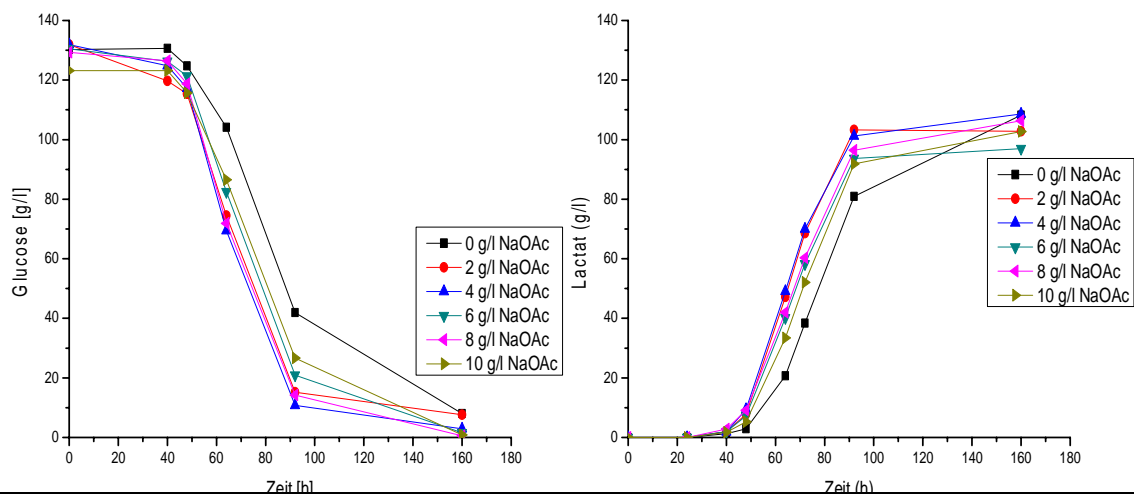


Abbildung 5.10: Variation der NaOAc-Konzentration für den *Sporolactobacillus putidus*.

5.9 Anhang: Einfluss von Spurenelementen und Magnesiumsulfat auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus*

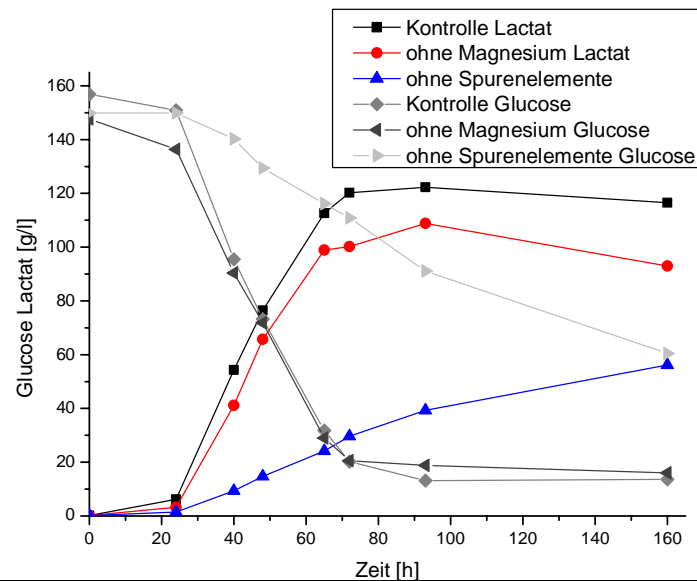


Abbildung 5.11: Einfluss von Spurenelementen und Magnesiumsulfat auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus*.

5.10 Anhang: Einfluss von Sulfat-Salzen der ersten Übergangsmetalle auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus*

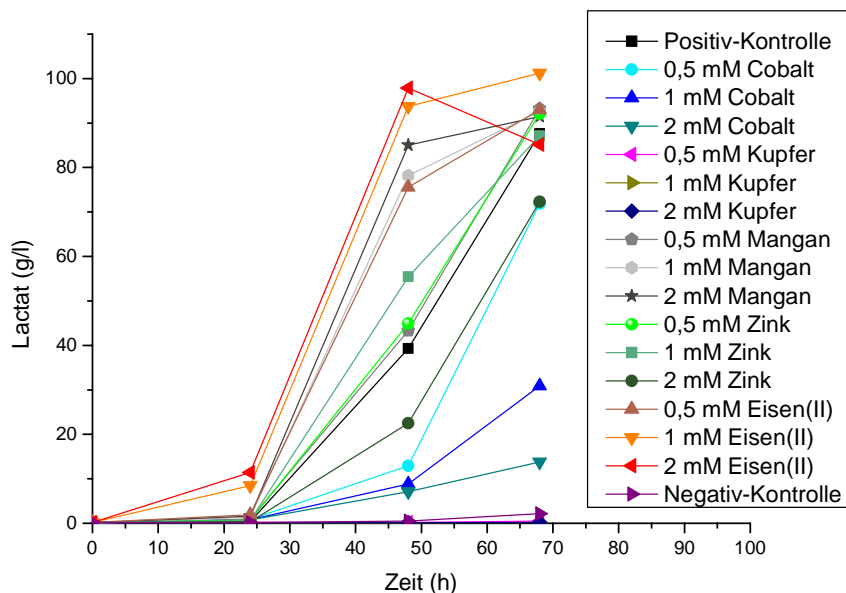


Abbildung 5.12: Einfluss von Sulfat-Salzen der ersten Übergangsmetalle auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus*.

5.11 Anhang: Einfluss von Spurenelementen und Magnesiumsulfat auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus putidus*

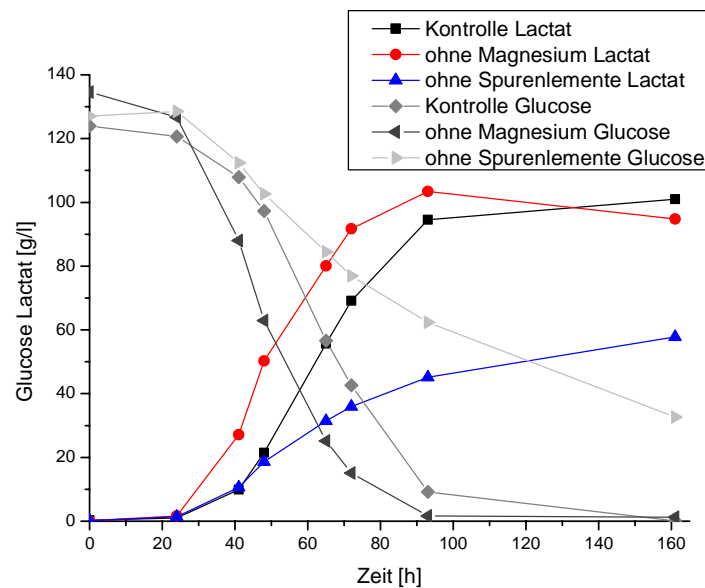


Abbildung 5.13: Einfluss von Spurenelementen und Magnesiumsulfat auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus putidus*.

5.12 Anhang: Untersuchung zur Nutzbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen bezüglich des *Sporolactobacillus inulinus*

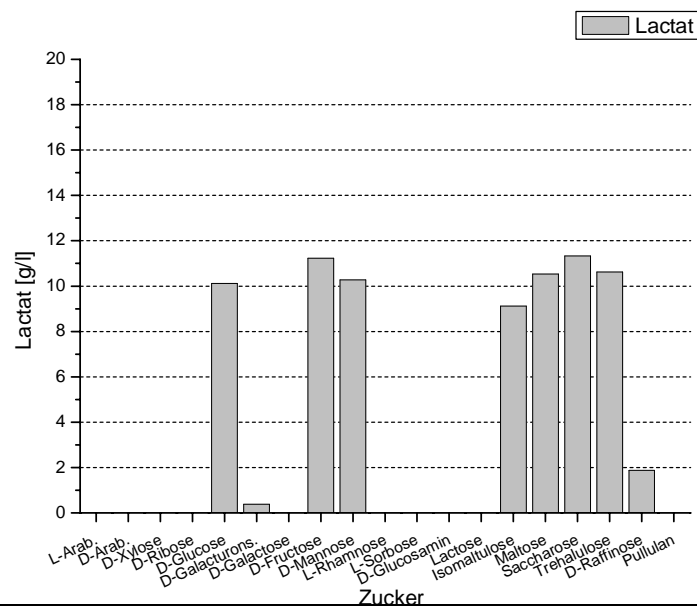


Abbildung 5.14: Untersuchung zur Nutzbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen bezüglich des *Sporolactobacillus inulinus*.

5.13 Anhang: Untersuchung zur Nutzbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen bezüglich des *Sporolactobacillus putidus*

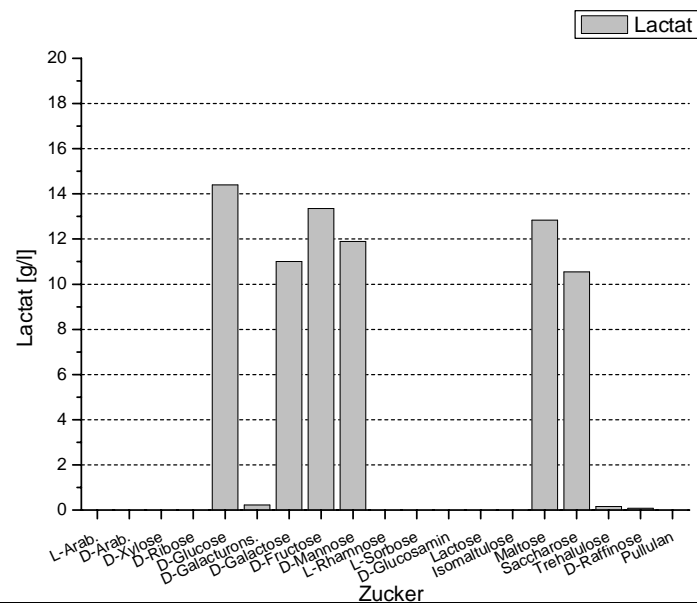


Abbildung 5.15: Untersuchung zur Nutzbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen bezüglich des *Sporolactobacillus putidus*.

5.14 Anhang: Untersuchung von alternativen Kohlenstoffquellen zur D-Lactatproduktion hinsichtlich des *Sporolactobacillus inulinus*

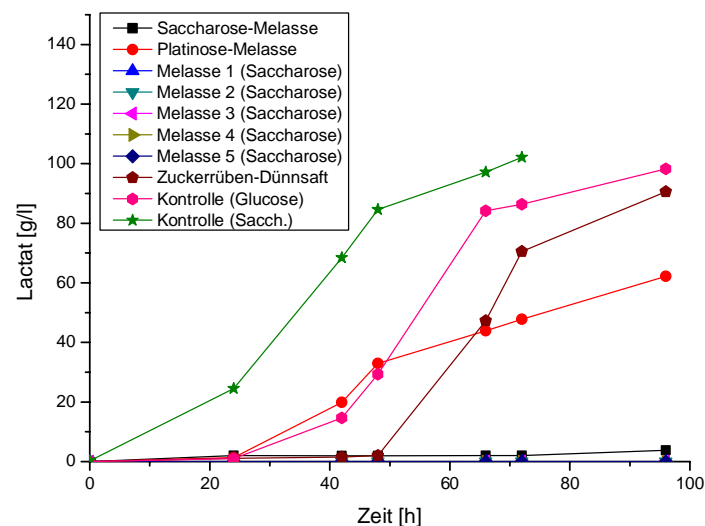


Abbildung 5.16: Untersuchung von alternativen Kohlenstoffquellen zur D-Lactat-Produktion hinsichtlich des *Sporolactobacillus inulinus*.

5.15 Anhang: Untersuchung von alternativen Kohlenstoffquellen zur D-Lactatproduktion hinsichtlich des *Sporolactobacillus putidus*

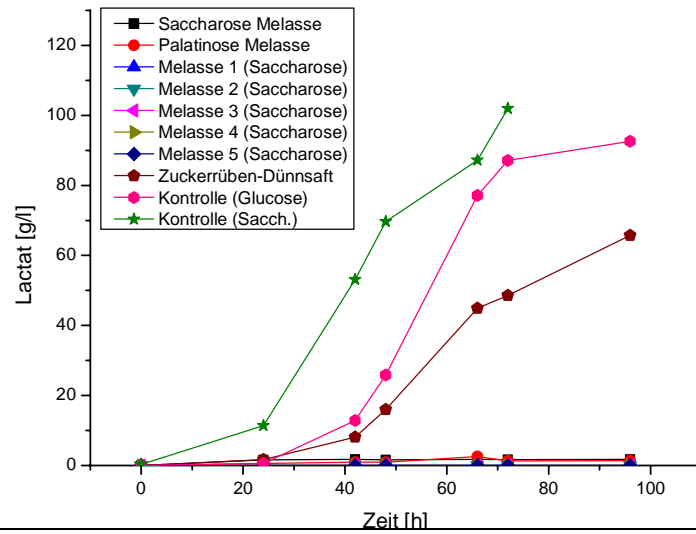


Abbildung 5.17: Anhang: Untersuchung von alternativen Kohlenstoffquellen zur D-Lactat-Produktion hinsichtlich des *Sporolactobacillus putidus*.

5.16 Anhang: Untersuchung zum Saccharose/ Glucose-Metabolismus hinsichtlich des *Sporolactobacillus inulinus*

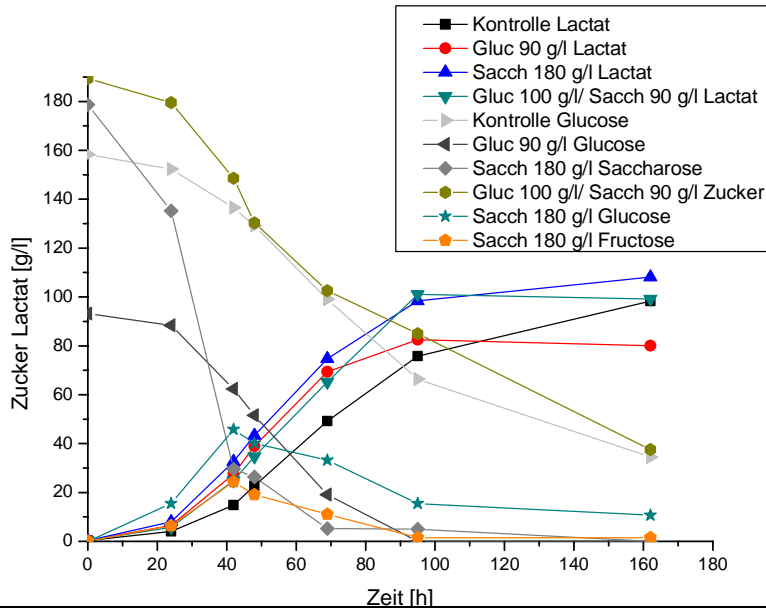


Abbildung 5.18: Untersuchung zum Saccharose/ Glucose-Metabolismus hinsichtlich des *Sporolactobacillus inulinus*.

5.17 Anhang: Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus* unter Stickstoff (N₂)-Atmosphäre und Einfluss von Kohlenstoffdioxid (CO₂)

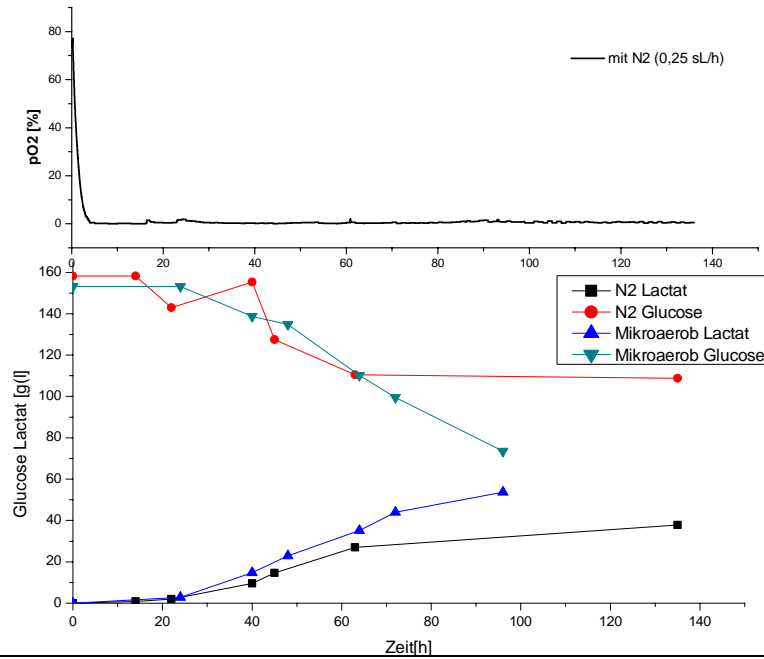


Abbildung 5.19: Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus* unter Stickstoff (N₂) -Atmosphäre.

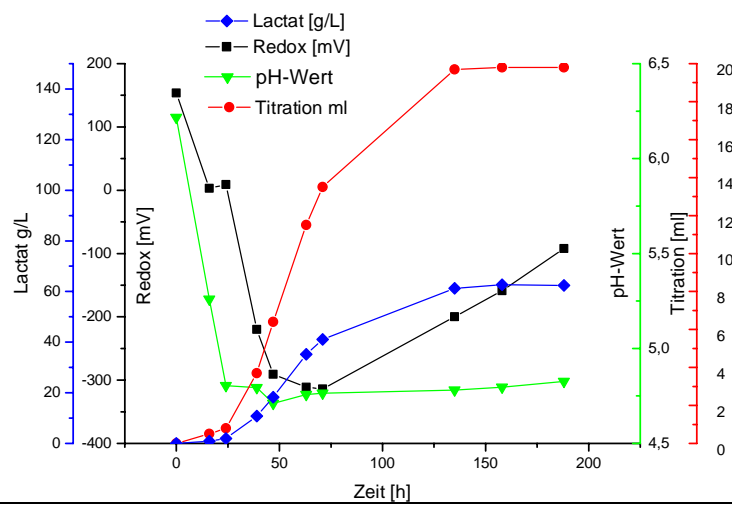
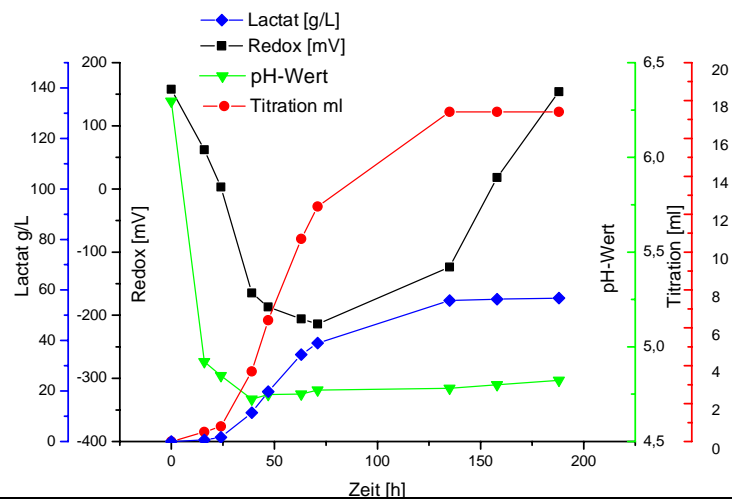
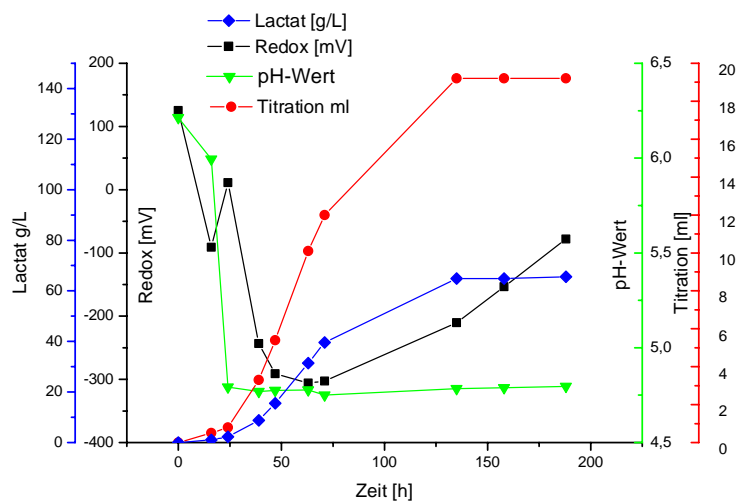
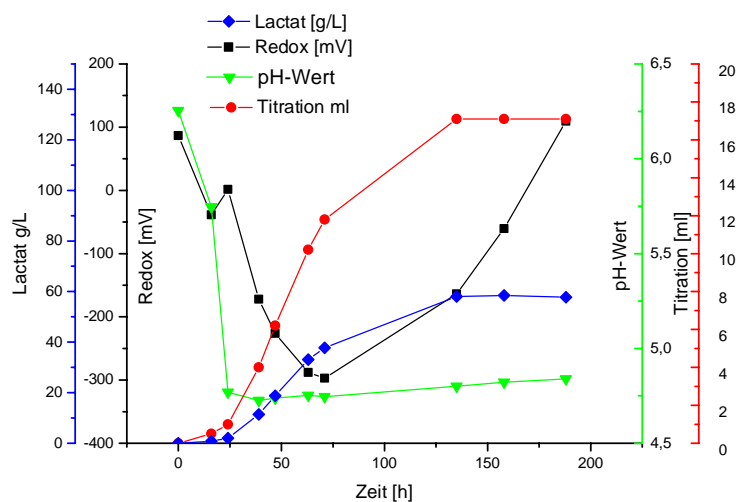


Abbildung 5.20: Ansatz mit NaOH unter N₂-Schutzgasatmosphäre.

Abbildung 5.21: Ansatz mit NaOH unter CO₂-Schutzgasatmosphäre.Abbildung 5.22: Ansatz mit KHCO₃ unter N₂-Schutzgasatmosphäre.Abbildung 5.23: Ansatz mit KHCO₃ unter CO₂-Schutzgasatmosphäre.

5.18 Anhang: Untersuchung über den Einfluss des pH-Werts für den *Sporolactobacillus* Spezies

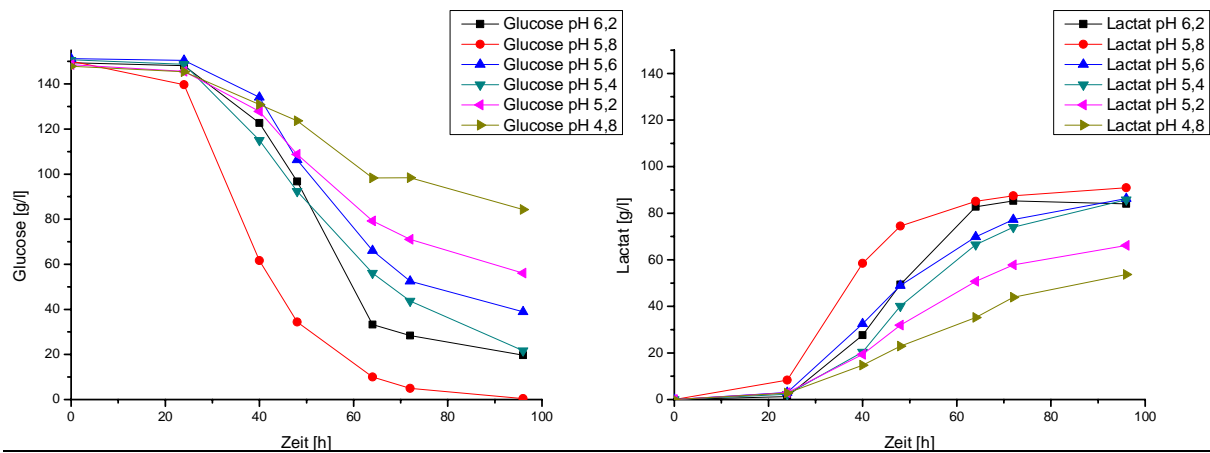


Abbildung 5.24: Untersuchung über den Einfluss des pH-Werts für den *Sporolactobacillus inulinus*.

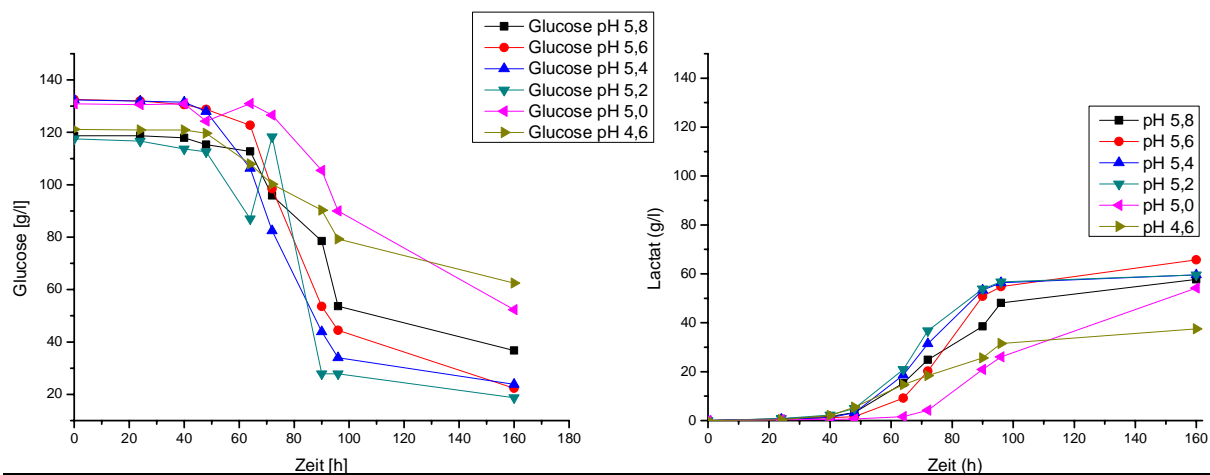


Abbildung 5.25: Untersuchung über den Einfluss des pH-Werts für den *Sporolactobacillus putidus*.

5.19 Anhang: Einfluss des Inokulums auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus* Spezies

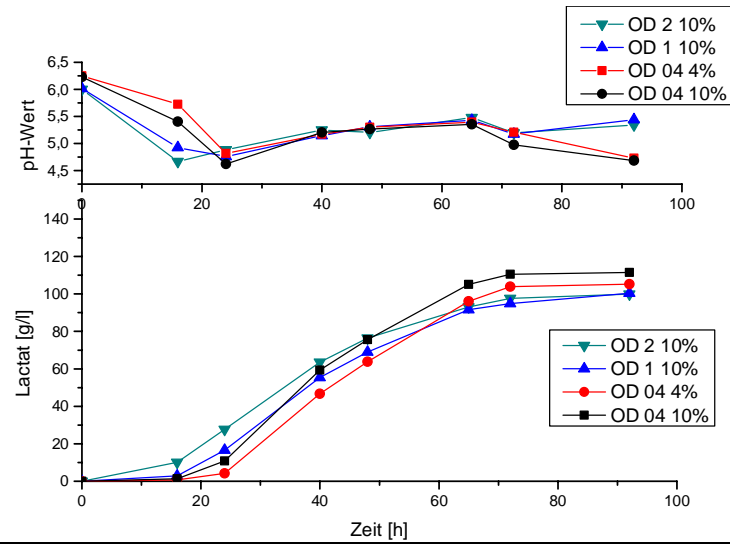


Abbildung 5.26: Einfluss des Inokulums auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus inulinus*.

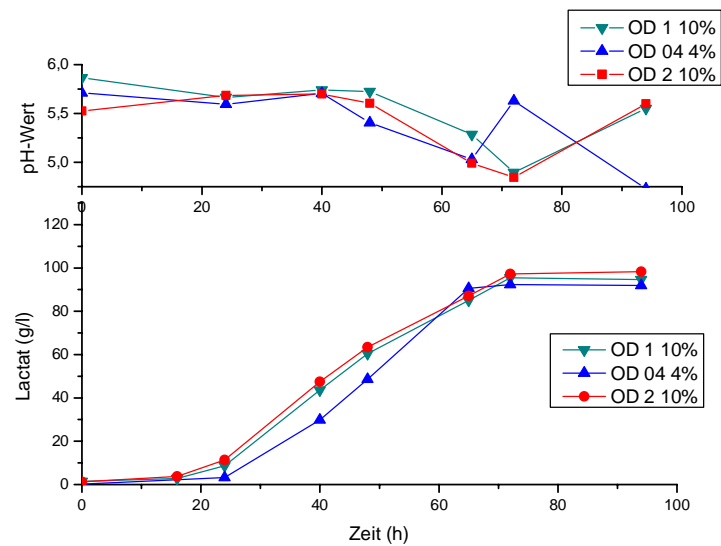


Abbildung 5.27: Einfluss des Inokulums auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus putidus*.

5.20 Anhang: Optimierung der D-Lactatproduktion im Bioreaktor mittels pH-Shift für den *Sporolactobacillus inulinus* mit NH₃-Lösung als Neutralisationsmittel

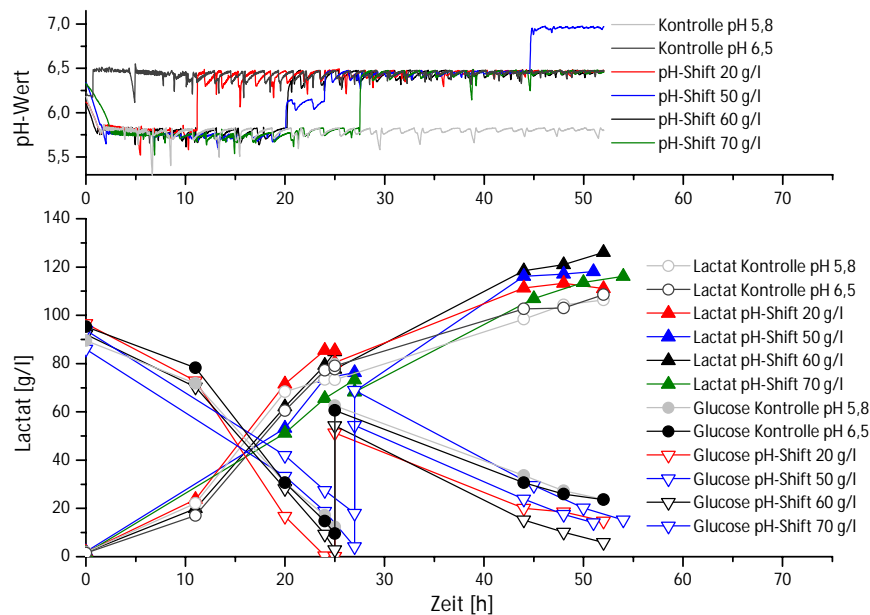


Abbildung 5.28: Optimierung der D-Lactat-Produktion im Bioreaktor mittels pH-Shift für den *Sporolactobacillus inulinus* mit NH₃-Lösung als Neutralisationsmittel.

5.21 Anhang: Immobilisierten Zellen mittels Lentikats® für den *Sporolactobacillus inulinus*



Abbildung 5.29: Lentikat®-Linse nach Batch 4. Färbung der Zellen mit Carbol-Fuchsin.

5.22 Anhang: Quantitative Phosphatanalyse zur Bestimmung des Phosphatbedarfs hinsichtlich des *Sporolactobacillus inulinus* im Bioreaktor

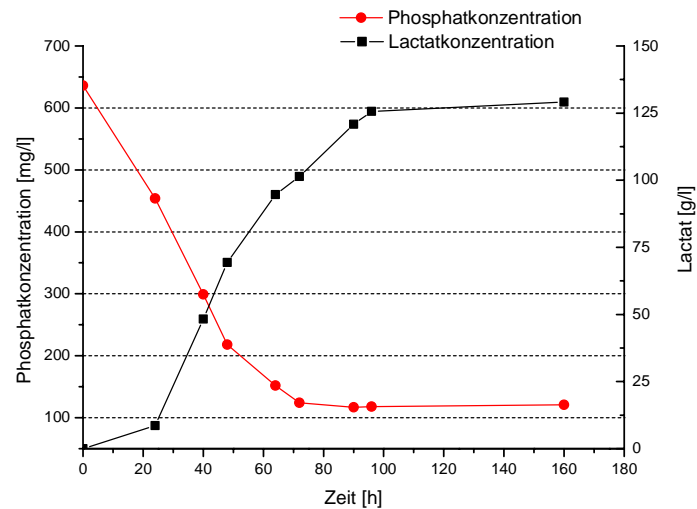
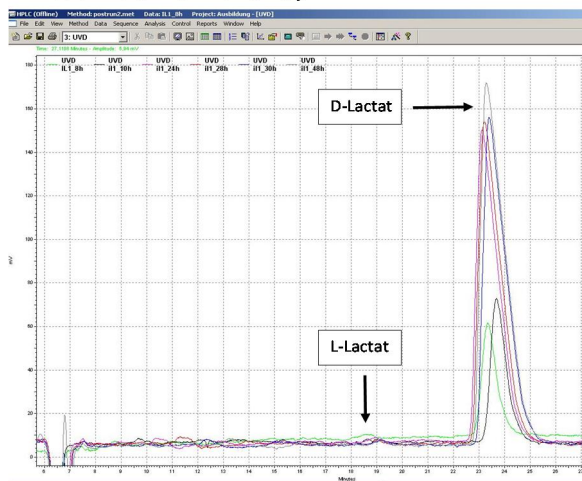


Abbildung 5.30: Quantitative Phosphatanalyse zur Bestimmung des Phosphatbedarfs hinsichtlich des *Sporolactobacillus inulinus* im Bioreaktor in Korrelation zur Lactat-Konzentration.

5.23 Chirale Bestimmung der Lactat-Enantiomere hinsichtlich des Kultivierungsexperiments mit ZRDS und RS mit 13,4 M $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ als Neutralisationsmittel

Ansatz 1: 8-48 h overlay



Ansatz 2: 8-48 h overlay

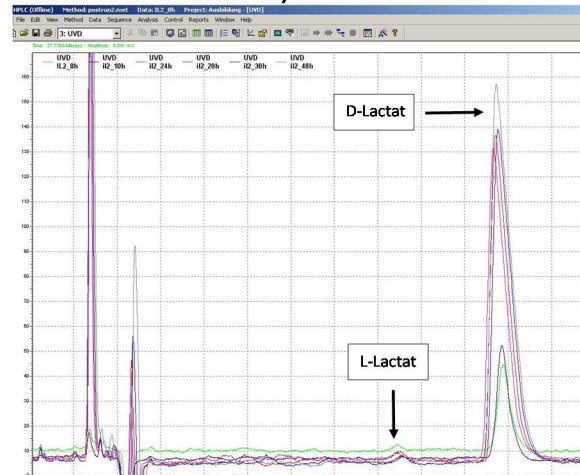


Abbildung 5.31: Chirale Messung der Lactatenantiomere. **Links:** Overlay 8-48 h von Ansatz 1. **Rechts:** Overlay 8-48 h von Ansatz 2.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe (H. Andruleit, A. Bahr, H. G. Babies, B. Hesse, J. Meßner, D. Rebscher, M. Schauer, S. Schmidt, P. Schulz, G. Goerne), *Energiestudie 2014 - Reserven, Ressourcen und Verfügbarkeit von Energierohstoffen*, **2014**.
http://www.deutscherohstoffagentur.de/DE/Themen/Energie/Downloads/Energiestudie_2014.pdf?_blob=publicationFile&v=7 (Stand 04.01.2016)
- [2] B. S. Levy, J. A. Patz, *Ann. Glob. Health* **2015**, 81(3), 310-322.
- [3] PlasticsEurope, Association of Plastics Manufacturers *Plastics – the Facts 2014/2015, An analysis of European plastics production, demand and waste data*, **2015**.
http://www.plasticseurope.org/documents/document/20150227150049final_plastics_the_facts_2014_2015_260215.pdf (Stand 04.01.2016)
- [4] Group Science, Technology and Society (STS), Copernicus Institute for Sustainable Development and Innovation, Utrecht University (L. Shen, J. Haufe, M. K. Patel), *Product overview and market projection of emerging bio-based plastics - PRO-BIP 2009*, **2009**.
http://www.uu.nl/sites/default/files/copernicus_probip2009_final_june_2009_revised_in_november_09.pdf (Stand 04.01.2016)
- [5] European Bioplastics, Institute for Bioplastics and Biocomposites - nova-Institute, *Bio-based Building Blocks and Polymers in the World – Capacities, Production and Applications: Status Quo and Trends Towards 2020*, **2015**, 3rd edition.
<http://bio-based.eu/markets/> (Stand 04.01.2016)
- [6] European Bioplastics, Institute for Bioplastics and Biocomposites, nova-Institute, *Bio-based Polymers in the World – Capacities, Production and Applications: Status Quo and Trends towards 2020*, 2013.
<http://bio-based.eu/markets/> (Stand 04.01.2016)
- [7] J. Waterschoot, S. V. Gomand, E. Fierens, J. A. Delcour, *Rev. Starch/Stärke* **2015**, 67, 1–13.
- [8] Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (J. Lörcks), *Biokunststoffe – Pflanzen, Rohstoffe, Produkte*, **2005**.
http://www.fnr-server.de/ftp/pdf/literatur/pdf_224biokunststoff_2006.pdf (Stand 04.01.2016)
- [9] H. Storz, K.-D. Vorlop, *Landbauforsch. Appl. Agric. Forestry Res.* **2013**, 63, 321-332.
- [10] T. P. Makarawo, R. A. Reynolds, M. L. Cullen, *Ann. Thorac. Surg.* **2015**, 99(2), 689-691.
- [11] R. Auras, L.T. Lim, S. E. M. Selke, H. Tsuji, *Poly(lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*, Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey **2010**.
- [12] H. Tsuji, *Macromol. Biosci.* **2005**, 5(7), 569-597.

- [13] Y. Sun, Xiong, Z. Dai, X. Pan, N. Tang, J. Wu, *Inorg. Chem.* **2015**, 55(1), 136–143.
- [14] A. C. Fecker, M. Freytag, P. G. Jones, N. Zhao, G. Zi, M. D. Walter, *Dalton Trans.* **2015**, 44(37), 16325-16331.
- [15] S. Pivsa-Art, T. Tong-ngok, S. Junngam, R. Wongpajan, W. Pivsa-Art, *Energy Procedia* **2013**, 34, 604–609.
- [16] X. Pang, X. Zhuang, Z. Tang, X. Chen, *Biotechnol. J.* **2010**, 5(11), 1125-1136.
- [17] G. Pegro, D. G. Cella, C. Bastioli, *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, 59, 37-43.
- [18] L. T. Lim, R. Auras, M. Rubino, *Prog. Polym. Sci.* **2008**, 33(8), 820-852.
- [19] R. A. Auras, S. P. Singh, J. J. Singh, *Packag. Technol. Sci.* **2005**, 18, 207–216.
- [20] Y. Ikada, K. Jamshidi, H. Tsuji, S. H. Hyon, *Macromol.* **1987**, 20(4), 904-906.
- [21] J. Zhang, H. Sato, H. Tsuji, I. Noda, Y. Ozaki, *Macromol.* **2005**, 38(5), 1822-1828.
- [22] D. Garlotta, *J. Polym. Environ.* **2001**, 9(2), 63-84.
- [23] R. P. John, G.S. Anisha, K.M. Nampoothiri, A. Pandey, *Biotechnol. Adv.* **2009**, 27, 145–152.
- [24] L. S. Sharninghausen, J. Campos, M. G. Manas, R. H. Crabtree, *Nat. Commun.* **2014**, 5, 5084.
- [25] L. S. Sharninghausen, B. Q. Mercado, R. H. Crabtree, N. Hazari, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 16201-16204.
- [26] T. Ghaffar, M. Irshad, Z. Anwar, T. Aqil, Z. Zulifqar, A. Tariq, M. Kamran, N. Ehsan, S. Mehmood, *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **2014**, 7(2), 222-229.
- [27] M. A. Abdel-Rahman, Y. Tashiro, K. Sonomoto, *J. Biotechnol.* **2010**, 156(4), 286-301.
- [28] M. A. Abdel-Rahman, Y. Tashiro, K. Sonomoto, *Biotechnol. Adv.* **2013**, 31(6), 877-902.
- [29] Assoziation ökologischer Lebensmittelhersteller (AöL): *Datenblatt PET*, **2015**.:
http://biokunststofftool.ael.org/fileadmin/ael/BioVP_downloads/Datenblaetter/PET.pdf (Stand 04.01.2016)
- [30] L. Dammer, M. Carus, A. Raschka, L. Scholz, *Market Developments of and Opportunities for bio-based products and chemicals*, **2013**.
<https://www.rijksoverheid.nl/binaries/rijksoverheid/documenten/rapporten/2014/05/28/market-developments-of-and-opportunities-for-biobased-products-and-chemicals/market-developments-of-and-opportunities-for-biobased-products-and-chemicals.pdf> (Stand 04.01.2016)

- [31] Assoziation ökologischer Lebensmittelhersteller (AöL): *Datenblatt PLA*, **2015**.
http://biokunststofftool.ael.org/fileadmin/ael/BioVP_downloads/Datenblaetter/PLA.pdf (Stand 04.01.2016)
- [32] P. Wouwe, M. Dusselier, A. Basiç, B.F. Sels, *Green Chem.* **2013**, *15*, 2817-2824.
- [33] Cellulac, *Cellulac–Corporate Presentation*, **2013**.
<http://cellulac.co.uk/en/wp-content/uploads/2013/02/Cellulac-Presentation.pdf> (Stand 04.01.2016)
- [34] B. P. Upadhyaya, L. C. DeVeaux, L. P. Christopher, *Trends Biotechnol.* **2014**, *32*(12), 637-644.
- [35] K. Okano, T. Tanaka, C. Ogino, H. Fukuda, A. Kondo, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*(3), 413-423.
- [36] Q. Wang, L.O. Ingram, K. T. Shanmugam, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*(47), 18920-18925.
- [37] S. Hama, S. Mizuno, M. Kihara, T. Tanaka, C. Ogino, H. Noda, A. Kondo, *Bioresour. Technol.* **2015**, *187*, 167-172.
- [38] S. Okino, M. Suda, K. Fujikura, M. Inui, H. Yukawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *78*(3), 449-454.
- [39] Y. Liu, W. Gao, X. Zhao, J. Wang, E. Garza, R. Manow, S. Zhou, *Bioresour. Technol.* **2014**, *169*, 559-565.
- [40] L. Zhou, D. D. Niu, K. M. Tian, X. Z. Chen, B. A. Prior, W. Shen, G. Y. Shi, S. Singh, Z. X. Wang, *Metab. Eng.* **2012**, *14*(5), 560-568.
- [41] Z. W. Wang, M. Saini, L. J. Lin, C. J. Chiang, Y. P. Chao, *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*(43), 9583-9589.
- [42] X. Feng, Y. Ding, M. Xian, X. Xu, R. Zhang, G. Zhao, *Bioresour. Technol.* **2014**, *172*, 269-275.
- [43] S. H. Baek, E. Y. Kwon, Y. H. Kim, J. S. Hahn, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*(6), 2737–2748
- [44] Amtsblatt der Europäischen Union, Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003.
http://www.bfr.bund.de/cm/343/verordnung_eg_1829_ueber_genetisch_veraenderte_lebensmittel_und_futtermittel.pdf (Stand 11.01.2016)
- [45] G. Giraffa, N. Chanishvili, Y. Widyastuti, *Res. Microbiol.* **2010**, *161*(6), 480-487.
- [46] O. Kandler, *Anton. Leeuw.* **1983**, *49*(3), 209-224.
- [47] T. Zaunmüller, M. Eichert, H. Richter, G. Unden, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *72*(3), 421-429.

- [48] P. Vandamme, B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters, J. Swings, *Microbiol. Rev.* **1996**, 60(2), 407–438.
- [49] A. H. Romano, T. Conway, *Res. Microbiol.* **1996**, 147(6-7), 448-55.
- [50] Y. Wang, Y. Tashiro, K. Sonomoto, *J. Biosci. Bioeng.* **2015**, 119(1), 10-18.
- [51] M. Coccagn-Bousquet, S. Even, N. D. Lindley, P. Loubière, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 60(1-2), 24-32.
- [52] A. Demirci, A. L. Pometto, *J. Ind. Microbiol.* **1992**, 11(1), 23-28.
- [53] Y. H. Chang, M. Y. Jung, I. S. Park, H. M. Oh, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2008**, 58(Pt 10), 2316-2320.
- [54] K. Hofvendahl, B. Hahn-Hägerdal, *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, 26(2-4), 87-107.
- [55] A.K. Yadav, A. B. Chaudhari, R. M. Kothari, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2011**, 31(1), 1-19.
- [56] J. N. Kim, S. J. Ahn, R. A. Burne, *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, 81(15), 5015-5025.
- [57] J. Utrilla, G. Gosset, A. Martinez, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 36(8), 1057-1062.
- [58] B. Koebmann, H. V. Westerhoff, J. L. Snoep, D. Nilsson, P. R. Jensen, *J. Bacteriol.* **2002**, 184(14), 3909-3916.
- [59] D. Liu, Y. Chen, A. Li, T. Zhao, T. Zhou, B. Li., J. Xie, X. Chen, J. Bai, Y. Hu, B. He, H. Ying, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, 168(2), 455-463.
- [60] W. N. Konings, *Anton. Leeuw.* **2002**, 82(1-4), 3-27.
- [61] W. N. Konings, J. S. Lolkema, H. Bolhuis, H. W. van Veen, B. Poolman, A. J. Driessen, *Anton. Leeuw.* **1997**, 71(1-2), 117-128.
- [62] B. Pieterse, R. J. Leer, F. H. Schuren, M. J. van der Werf, *Microbiology* **2005**, 151(Pt 12), 3881-3894.
- [63] M. Altaf, M. Venkateshwar, M. Srijana, G. Reddy, *J. Appl. Microbiol.* **2007**, 103(2), 372-380.
- [64] C. M. Nguyen, J. S. Kim, T. N. Nguyen, S. K. Kim, G. J. Choi, Y. H. Choi, K. S. Jang, J. C. Kim, *Bioresour. Technol.* **2013**, 146, 35-43.
- [65] C. M. Nguyen, G. J. Choi, Y. H. Choi, K. S. Jang, J. C. Kim, *Biochem. Eng. J.* **2013**, 81, 40-46.
- [66] Z. Lu, M. Lu, F. He, L. Yu, *Bioresour. Technol.* **2009**, 100(6), 2026-2031.
- [67] B. P. Calabia, Y. Tokiwa, *Biotechnol. Lett.* **2007**, 29(9), 1329-1332.

- [68] L. Wang, B. Zhao, F. Li, K. Xu, C. Ma, F. Tao, Q. Li, P. Xu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 89(4), 1009-1017.
- [69] Y. Li, L. Wang, J. Ju, B. Yu, Y. Ma, *Bioresour. Technol.* **2013**, 142, 186-191.
- [70] T. Zhao, D. Liu, H. Ren, X. Shi, N. Zhao, Y. Chen, H. Ying, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, 28;24(12), 1664-1772.
- [71] S. R. R. Tadi, E. V R A, A. M. Limaye, S. Sivaprakasam, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2015**, doi: 10.1002/bab.1470.
- [72] S. Nakano, C. U. Ugwu, Y. Tokiwa, *Bioresour. Technol.* **2012**, 104, 791-794.
- [73] S. S. Salek, A. G. van Turnhout, R. Kleerebezem, M. C. van Loosdrecht, *Biotechnol. Bioeng.* **2015**, 112(5), 905-913.
- [74] I. H. Aljundi, J. M. Belovich, O. Talu, *Chem. Eng. Sci.* **2005**, 60(18), 5004-5009.
- [75] V. Hábová, K. Melzoch, M. Rychtera, *Desalination* **2004**, 162, 361-372.
- [76] K. L. Wasewar, *Chem. Biochem. Eng.* **2005**, 19(2), 159-172.
- [77] H. Huan, Y. S. Yang, D. E. Ramey, *Appl Biochem Biotechnol.* **2004**, 113-116, 671-88.
- [78] P. Kasinathan, H. Kwaka, U. Leea, D. W. Hwanga, Y. K. Hwanga, J. S. Changa, *Sep. Purif. Technol.* **2010**, 76, 1–7.
- [79] L.-C. Maillard, *Compt. Rend. Hebd. Seances Acad. Sci.* **1912**, 159, 66-68.
- [80] R. E. Kitson, M. G. Mellon, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **1944**, 16(6), 379-383.
- [81] V. A. Davankov, *Chromatographia* **1989**, 27(9), 475-482.
- [82] L.-C. Maillard, *Compt. Rend. Hebd. Seances Acad. Sci.* **1912**, 159, 66-68.
- [83] C. Helou, D. Marier, P. Jacolot, L. Abdennebi-Najar, C. Niquet-Léridon, F. J. Tessier, P. Gadonna-Widehem, *Amino Acids* **2014**, 46(2), 267-277.
- [84] K. Kitahara, S. Suzuki, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1963**, 9(1), 59-71.
- [85] R. Fujita, K. Mochida, Y. Kato, K. Goto, *Int. J Syst. Evol. Micr.* **2010**, 60, 1499-1503.
- [86] X. Cao, H. J. Lee, H. S. Yun, Y. M. Koo, *Korean J. Chem. Eng.* **2001**, 18(1), 133-135.
- [87] N. Anders, *Cuvillier, Technische Universität Braunschweig, Dissertation* **2014**.
- [88] L. Zheng, T. Xu, Z. Bai, B. He, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, 98(4), 1583-1593.

- [89] D. Gianini, R. M. Petrovich, L. L. Edwards, R. P. Mason, *Biochim. Biophys. Acta*. **2015**, 1850(9), 1795-1805.
- [90] M. Almirón, A. J. Link, D. Furlong, R. Kolter, *Genes Dev.* **1992**, 6(12B), 2646-2654.
- [91] S. Skråmo, H. P. Hersleth, M. Hammerstad, K. K. Andersson, A. K. Røhr, *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **2014**, 70(6), 777-780.
- [92] L. Zhu, X. Xu, L. Wang, H. Dong, B. Yu, Y. Ma, *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, 81(18), 6294-6301.
- [93] L. Zheng, Z. Bai, T. Xu, B. He, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 39(11), 1685-1692.
- [94] K. Takara, K. Ushijima, K. Wada, H. Iwasaki, M. Yamashita, *J. Oleo Sci.* **2007**, 56(11), 611-614.
- [95] A. Dumbrepatil, M. Adsul, S. Chaudhari, J. Khire, *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, 74(1), 333-335.
- [96] J. Deutscher, *Curr. Opin Microbiol.* **2008**, 11(2), 87-93.
- [97] Y. Fujita, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, 73(2), 245-259.
- [98] J. S. Teixeira, R. Abdi, M. S. Su, C. Schwab, M. G. Gänzle, *Food Microbiol.* **2013**, 36(2), 432-439.
- [99] S. Doores, D. C. Westhoff, *J. Appl. Bacteriol.* **1983**, 54(2), 273-280.
- [100] C. G. Liu, C. Xue, Y. H. Lin, F. W. Bai, *Biotechnol. Adv.* **2013**, 31(2), 257-265.
- [101] M. Mols, R. Kranenburg, M. H. Tempelaars, W. van Schaik, R. Moezelaar, T. Abee, *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, 137(1), 13-21.
- [102] T. Mimitsuka, K. Na, K. Morita, H. Sawai, S. Minegishi, M. Henmi, K. Yamada, S. Shimizu, T. Yonehara, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, 76(1), 67-72.
- [103] Y. Tashiro, W. Kaneko, Y. Sun, K. Shibata, K. Inokuma, T. Zendo, K. Sonomoto, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 89(6), 1741-1750.
- [104] M. Rosenberg, M. Rebros, L. Kristofíková, K. Malátová, *Biotechnol. Lett.* **2005**, 27(23-24), 1943-1947.
- [105] A. Kuenz, S. Klotz., N. Kaufmann, K.-D. Vorlop, *Biotechnisch erzeugte D-Milchsäure, Abschlussbericht FNR*, **2015**, 1-68.